
Л.М. Шафран, Е.Г. Пыхтеева, Д.В. Большой

МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ

Одесса – 2011

УДК 612.126:159.9

Рекомендовано к печати ученым советом Украинского НИИ медицины транспорта, протокол № 7 от 18 ноября 2011 г.

Рецензенты:

Гжегоцкий М.Р. — доктор медицинских наук, профессор, чл.-корр. АМН Украины, проректор и зав. кафедрой нормальной физиологии Львовского национального медицинского университета им. Д. Галицкого

Губский Ю.И. — доктор медицинских наук, профессор, чл.-корр. АМН Украины, зав. кафедрой биохимии Киевского национального медицинского университета им. А.А. Богомольца

Шафран Л.М., Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В. Металлотионеины / Под редакцией проф. Л.М. Шафрана – Одесса: Издательство "Чорномор'я", 2011. – 428 с.

В монографии впервые в отечественной литературе проведен детальный анализ публикаций последних лет и результатов собственных исследований авторов по различным аспектам биохимии, молекулярной биологии, геномике, клинической и экспериментальной токсикологии одного из чрезвычайно распространенных в живой природе, высоко специфичных биологически активных низкомолекулярных белков, выполняющих в организме транспортные, дезинтоксикационные и другие информационно-коммуникативные функции, что имеет важное значение в развитии ряда заболеваний, металлотоксикозов и возрастной патологии, а также в формировании системы защиты организма. Предназначена для врачей, биохимиков, токсикологов, патофизиологов, морфологов и биологов широкого профиля, аспирантов и студентов медицинских, биологических вузов, всех лиц, интересующихся вопросами современной биохимии, молекулярной биологии и токсикологии.

У монографії вперше у вітчизняній літературі проведено детальний аналіз публікацій останніх років та результатів особистих досліджень авторів з різних аспектів біохімії, молекулярної біології, геноміки, клінічної та експериментальної токсикології одного з надзвичайно розповсюджених у живій природі, високо специфічних і біологічно активних низькомолекулярних білків, що виконують в організмі транспортні, детоксикаційні, а також інші інформаційно-комунікативні функції, що має важливе значення у розвитку ряду захворювань, металлотоксикозів і вікової патології, а також у формуванні системи захисту. Призначена для лікарів, біохіміків, токсикологів, патофізіологів, морфологів і біологів широкого профілю, аспірантів та студентів медичних і біологічних вузів, всіх осіб, що мають інтерес до проблем сучасної біохімії, молекулярної біології і токсикології.

In the monograph for the first time in the domestic literature the detailed analysis of the last years publications and results of the authors own researches is carried out on various aspects of biochemistry, molecular biology, genomics, clinical and experimental toxicology of one of extremely widespread in wildlife, high specific and biologically active class of low-molecular proteins – metallothioneins. They are carrying out in an organism transport, desintoxicating and other informative and communicative functions that has great value in development of some diseases, metallothixoses and an age pathology, and also in protective system formation. It is intended for doctors, biochemists, toxicologists, pathophysiologicals, morphologists and biologists of a wide structure, post-graduate students and students of medical and biological universities and departments, all persons who are interested in problems of modern biochemistry, molecular biology and toxicology.

ISBN 978-966-555-082-2

Видавництво "Чорномор'я", 2011

© Шафран Л.М., Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В., 2011

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав.

Содержание

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	10
РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ	20
1.1. УЧАСТИЕ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В БИОГЕНЕЗЕ И ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ОРГАНИЗМОВ.....	20
1.2. КЛАССИФИКАЦИИ БИОЭЛЕМЕНТОВ И МЕТАЛЛОВ ПО ИХ РОЛИ В ОРГАНИЗМЕ	24
1.3. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕТАЛЛОВ	33
1.4. ПОСТУПЛЕНИЕ, РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И БИОДЕГРАДАЦИЯ СОЕДИНЕНИЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ОРГАНИЗМЕ	35
1.5. МЕТАЛЛЫ В БИОСРЕДАХ.....	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	54
РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ	55
2.1. ОБРАЗОВАНИЕ МЕТАЛЛО-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ	55
2.2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ	58
2.3. ЭЛЕМЕНТЫ КООРДИНАЦИОННОЙ ХИМИИ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ	59
2.4. ПРИМЕРЫ РАЗНООБРАЗИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ.....	66
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)	94
3.1. СТРУКТУРА БЕЛКА И ЕГО ИЗОФОРМЫ	95
3.2. ГЕНОМИКА И ИНДУКЦИЯ СИНТЕЗА МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ.....	112

Содержание

3.3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ И ИММУНИТЕТ	134
3.4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ И ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС	152
3.5. ТРАНСПОРТНАЯ ФУНКЦИЯ МТН И ЕГО УЧАСТИЕ В РЕГУЛЯЦИИ ГОМЕОСТАЗА ЦИНКА.....	169
3.6. РЕГУЛЯТОРНАЯ И СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНА	179
3.7. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МТН	186
3.7.1. <i>Физико-химические методы анализа структуры.....</i>	187
3.7.2. <i>Современные методы количественного определения металлотионеинов.....</i>	188
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	203
РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА.....	204
4.1. РОЛЬ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ДЕТОКСИКАЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ	205
4.1.1. <i>Кадмий</i>	207
4.1.2. <i>Ртуть.....</i>	230
4.2. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ПОЧЕК.....	240
4.3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ ПРИ ГЕПАТОТОКСИКОЗАХ.....	267
4.4. МЕТАЛЛОТИОНЕИН И НЕРВНАЯ СИСТЕМА	277
4.5. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ И АПОПТОЗ	301
4.6. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ	324
4.7. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ, ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ.....	334
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	348
ЛИТЕРАТУРА.....	361

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

6-IAF	6-йодацетамидофлуоресцеин — реагент на тиоловые группы
AD	Болезнь Альцгеймера
AIF	Стимулирующий апоптоз фактор
ALDOST	Препарат альдостерон в смеси с NaCl
AOPP	Продукт окисления белка
APP	β -amiloid precursor protein – белок-предшественник амилоидных образований
Arfs	Семейство АДФ-рибозилирующих факторов
ARFs	АДФ-рибозилирующий фактор
ATP7A, ATP7B	АТФ-азы Р-типа
Bcl-3	Фактор транскрипции, белок
Bcl-x ₁ , Bcl-2	Семейство генов, включенных в апоптоз
BDNF	Нейротрофический фактор
CAT-2	Катионный транспортер аминокислот
CAT-2	Катионный транспортер аминокислот
CCS	Шаперон меди
CDF	Транспортер катионов (Cation Diffusion Facilitator)
CFTCR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator — трансмембранный регулятор
cGMP	Циклический гуанозинмонофосфат
ckMTH	МТН птиц (кур)
c-Rel	Фактор транскрипции, белок
Ctr1	Внутриклеточный транспортер меди
Ctr2, Ctr1	Белок — транспортер меди
Cys	Цистеин
DMT-1	Транспортер двухвалентных катионов
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота — комплексон
ELISA	Иммуноферментный анализ (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FPF-1070	Церебролизин
FRE1, FRE2	Ферриредуктазы

МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – Л.М. Шафран, Е.Г. Пыхтеева, Д.В. Большой

FYVE	Домен для специфического связывания фосфатидилинозитол-3-фосфата
GDNF	Нейротрофический фактор
GFAP	Glial fibrillary acidic protein — кислый фибриллярный глиальный белок
GRE	Глюкокортикоидный эффектор
GSH	Глутатион
GSK-3 β	3 β -гликогенсинтазокиназа
GSSG	Окисленный глутатион
HAH1	Металлошаперон меди
Hb	Гемоглобин
HIPK-2	Протеинкиназа-2
hMTH	MTH человека
Hr	Гепсидин
Hsp70-2	Белок из семейства белков теплового шока
IC ₅₀	50 %-ая ингибирующая концентрация
ICP-MS	Масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой
IFN	Интерферон
IL-1	Интерлейкин, цитокин острой фазы
IL-6	Провоспалительный цитокин – интерлейкин 6
iNOS	Изоформа NO-синтазы
IRE	Железорегуляторный элемент
IRP1	Fe-зависимый транскрипционный фактор
ISTERH	International Society for Trace Element Research in Humans — Международное общество по изучению роли микроэлементов в организме человека
KTL	T-лимфоцит
KK	Клетки Купфера
LEC	Линия крыс, нокаутных по гену церулоплазмину
LLC-PK1	Линия эпителиальных клеток проксимальных канальцев крыс
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) — небольшой цитокин из семейства хемокинов

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor — цитокин, который влияет на дифференцирование гемопоэтических стволовых клеток в макрофаги
MLC	Смешанная культура лимфоцитов
MRAP-1	Multidrug resistance-associated protein 1 Посредник экспорта органических анионов и лекарств из цитоплазмы. Придает устойчивость к противоопухолевым препаратам. Гидролизует АТФ с низкой эффективностью.
MRE	Металл-чувствительный элемент
MSCs	Миелоидные клетки-супрессоры
MTF-1	Металлзависимый транскрипционный фактор
МФ	Макрофаги
NF- κB	Универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла
НК-клетки	Природные киллеры – клетки иммунной системы. Особая популяция больших гранулярных лимфоцитов
NKT-клетки	Подкласс Т-клеток, которому присущи фенотипические особенности как Т-клеток, так и НК-клеток. NKT несут на своей поверхности Т-клеточный рецептор и маркеры НК-клеток (CD16, CD56, CD161).
NMF	Ядерно-митохондриальная фракция
NOS	NO-синтаза
NOX	Никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидаза
NPC1	Внутриклеточный Cu-транспортирующий белок Неймана-Пика типа С
OVE26	Линия трансгенных мышей с врожденным диабетом
p50, p65, p52	Факторы транскрипции, белки
p53, p21	Белки теплового шока
PARP-1	Поли(АДФ-рибозо)полимераза-1
PGE	Простагландины
PKCι	Протеинкиназа С1 типа
PTPs	Протеинтирозиновые фосфатазы

МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – Л.М. Шафран, Е.Г. Пыхтеева, Д.В. Большой

PZ120	Белок семейства Zinc Finger Protein
Rab	Семейство внутриклеточных белков–активаторов эндосомального антигена EEA1
RelB	Фактор транскрипции, белок
RIA	Радиоиммуноанализ
SCF	Цитозольная фракция
SFKs	Киназы семейства Src
SLC39A8, SLC39A14	Транспортеры семейства ZIP
STAT	Активирующие белки (сигнальные датчики и активаторы транскрипции) посредством цитокинов
TCEP	Трис-(2-карбоксииэтил)фосфин
Th1	T-1 хелперы
TLR	<i>Toll-like receptors</i> Толл-подобные рецепторы — класс клеточных рецепторов с одним трансмембранным фрагментом, которые распознают консервативные структуры микроорганизмов и активируют клеточный иммунный ответ.
TNF- α	α -фактор некроза опухоли
T _R	Восстановленный апо-металлотионеин — тионеин
TRPM7	Transient receptor potential melastatin-like 7
Ts65Dn	Трансгенные мыши модели синдрома Дауна
WRL-68	Линия клеток печени человека
ZIP	Транспортер цинка (Zrt-, Irt-like Protein)
ZnT	Транспортер цинка
$\alpha\beta$ -Crist	$\alpha\beta$ -кристаллин
α -Syn	α -синуклеин
α -GST	Альфа-глутатион-S-трансфераза
АДГ	Алкогольдегидрогеназа
АОС	Антиоксидантная система
АТФ	Аденозинтрифосфат
АФК	Активные формы кислорода
БП	Болезни Паркинсона
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

Г-S-T	Глутатион-S-трансфераза
ГА-3-ФДГ	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы
ГП	Глутатионпероксидаза
ГР	Глутатионредуктаза
ЕЕА1	Early endosome antigen 1 — мембранный внутриклеточный белок массой 162 кДа
КА	Каталазы
ЛПС	Липополисахарид
МАИР	Международное агентство по исследованию рака
мкМ	мкмоль/л
МТН	Металлотионеин
МХ	Митохондрии
НДЗ	Нейродегенеративные болезни
ПК	Парехимальные клетки
ПОЛ	Переокисное окисление липидов
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РОСМЭМ	Российское общество медицинской элементологии
РСА	Рентгеноструктурный анализ
РТК	Тирозиновые протеинкиназы
СОД	Супероксиддисмутаза
ТМ	Тяжелые металлы
T _o	Окисленный апо-металлотионеин — тионин
ТФ	Трансферрин
ТХУ	Трихлоруксусная кислота
УФ	Ультрафиолетовый
ФАО	Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН
ФР	Ферритин
ЦНС	Центральная нервная система
ЦП	церулоплазмин
ЩФ	Щелочная фосфатаза
ЭК	Эндотелиальные клетки
ЭО	Электроотрицательность

ВВЕДЕНИЕ

Жизнь на нашей планете сосредоточена главным образом в биосфере, которая, по В.И. Вернадскому [1], представляет одну из концентрических геологических оболочек Земли, где сосредоточена основная часть живого вещества. «Организм, — писал В. И. Вернадский, — имеет дело со средой, к которой он не только приспособлен, но которая приспособлена к нему». Биосфера, согласно предложенной этим выдающимся ученым концептуальной модели, имеет совершенно оригинальный химический атомный состав, в котором господствуют легкие атомы (13 элементов) и лишь один тяжелый – железо с атомным весом 55,84. Однако, практически во всех живых организмах в виде следов в рассеченном состоянии обнаруживаются все другие элементы.

Физиологи считают необходимыми для жизни те химические элементы, отсутствие которых или нахождение в количествах ниже определенного минимума оказывает вредное действие на организм. Такое ограничение лимитируется нашими знаниями. Так, сам В.И. Вернадский указывал на недостаточную изученность в плане биологической значимости 17 химических элементов, главным образом тяжелых («43 мазурий, 44 рутений, 45 родий, 46 палладий, 512 сурьма, 52 теллур, 72 гафний, 73 тантал, 74 вольфрам, 75 рений, 76 осмий, 77 иридий, 78 платина, 80 ртуть, 81 таллий, 83 висмут, 91 протактиний, а также 15 элементов “редкие земли” от 57 лантана до 71 лютеция»). Этим он подчеркивал не только отсутствие достоверной научной информации о биогенной роли 39 химических элементов или 42,6% из числа обнаруживаемых в живом веществе, но и предостерегал от поспешного отнесения того или иного элемента к категориям «эссенциальный» и «токсичный». Такая позиция затем неоднократно обсуждалась в научных кругах. В частности, ей посвятили большое число своих исследований такие признанные ученые в области химии и биологии микроэлементов, как А.П. Авцын, М. Анке, В.П. Антонович, Г.А. Бабенко, Х. Зигель, А.В. Скальный, И.М. Трахтенберг, Г. Эйхорн, В.А. Fowler, L.T. Friberg, P.B. Hammond, E. Nieboer, G.F. Nordberg,

R.K.O. Sigel, G. Sposito, K. Takatera, T. Watanabe, R.K. Zalups и др. Они существенно расширили наши знания о роли геологических, физико-химических, алиментарных процессов природного и антропогенного генеза в круговороте элементов в биосфере, раскрыли взаимосвязи между концентрационными, окислительно-восстановительными и другими биохимическими функциями неорганических компонентов биосферных комплексов в процессе эволюции, жизнедеятельности отдельных особей и биологических видов в целом. При этом традиционно наибольшее внимание уделяется металлам (от лат. *metallum* — шахта) — химическим элементам, которые характеризуются развитыми координационными связями, разнообразными физико-химическими и биологическими («металлическими») свойствами, щедро и разнообразно используемыми природой в биосинтетических, структурных, энергетических и элиминационных целях [2, 3]. Прежде всего металлам мы обязаны появлению и интенсивному развитию в 50-х годах XX столетия научной дисциплины, получившей наименование «неорганическая биохимия». Этот термин, по мнению Г. Эйхорна [4], «должен ассоциироваться с идеей участия ионов металлов в биологических процессах», отражая «применение принципов координационной химии металлов в биологии».

Металлами являются большинство (примерно 80 %) химических элементов на нашей планете, тогда как на неметаллы приходится около 20 %. Самым распространенным металлом в земной коре является алюминий. Все металлы (кроме ртути) при нормальных условиях — твердые вещества. Температуры плавления лежат в диапазоне от $-39\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ртуть) до $3410\text{ }^{\circ}\text{C}$ (вольфрам). В зависимости от их плотности, металлы делят на лёгкие (плотность $0,53\text{--}5\text{ г/см}^3$) и тяжёлые ($5\text{--}22,5\text{ г/см}^3$).

Металлы играют важную роль во всех природных системах Земли. Об этом косвенно свидетельствует уже сам факт повсеместного нахождения ионов металлов в растительных, животных организмах, бактериях и грибах. Например, если вес человека составляет 70 кг, то в нём содержится (в граммах): Ca — 1700, K — 250, Na — 70, Mg — 42, Fe

— 5, Zn — 3. На долю металлов приходится 2,1 кг [5]. Содержание других металлов (медь, марганец, молибден, кобальт, ванадий, олово, хром) существенно ниже (5-100 мг), но их биологическая значимость также является доказанной [6, 7]. Лишь функции отдельных, относительно немногих, металлов в биосистемах пока вообще не известны либо недостаточно изучены. Тем не менее, не вызывает сомнений, что эволюция биосферы во многом обязана своим прогрессом, био-разнообразием, тонким и точным регулированием, избирательной направленностью, качественным и количественным характеристикам биогенеза, проявлением адаптивных и защитных функций удивительному — *миру металлов*.

Биологическая активность ряда металлов проявляется при наличии в биосистемах и макромолекулах единичных атомов, а суммарное содержание в организме человека не превышает 1-5 г. Вероятно, именно исходя из этих соображений, данная группа металлов получила название *следовых металлов (trace metals)*. Они входят в число микроэлементов, которые в настоящее время интенсивно изучаются биологами, медиками, химиками в различных странах.

И хотя именно этим химическим соединениям и их разнообразной роли в биосфере, живых системах, клетках и организмах посвящены многие главы биофизики, биохимии, бионеорганической химии, молекулярной биологии, физиологии и патологии человека, животных и растений, проблема остается актуальной и активно разрабатываемой.

Изучению биологии, физиологии, токсикологии металлов, их роли в биосистемах и организмах, находящихся на разных ступенях эволюции и иерархии в биосфере Земли, посвящен ряд монографий, руководств, учебных пособий, серийных изданий. Среди них ставшие стали настольными книгами для широкого круга ученых, специалистов, преподавателей, аспирантов и студентов, издания, такие как, например, “Handbook of Metalloproteins” [8], “Handbook on the Toxicology of Metals” (G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, L.T. Friberg eds.) [9], выдержавшее 3 издания с 1986 по 2007 год, «Биологическая роль макро- и микроэлементов у чело-

века и животных» (Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А., 2008 [10]), «Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов» под ред. Н.И. Калетиной (2008) [11]. Швейцарские ученые Гельмут, Аристид и Рональд Зигель, в тесном сотрудничестве с издательством John Wiley & Sons с 2006 г. начали выпускать новую серию монографий по бионеорганической химии «Ионы металлов в науках о жизни» («Metal Ions in Life Sciences») [12], подчеркивая тем самым необходимость перехода от характеристики отдельных биологических систем к интеграции наших знаний применительно к жизнедеятельности организма в целом. Каждый из томов, которые в настоящее время издаются под эгидой Royal Society of Chemistry, содержит 12-18 обзоров, подготовленных группой международно-признанных экспертов. Серия продолжает 44-томное издание «Ионы металлов в биологических системах» («Metal Ions in Biological Systems») [13]. К настоящему времени вышло 7 томов, посвященных различным актуальным аспектам проблемы, в которых интегрируются результаты проведенных к моменту выхода каждого тома научных исследований. Все это существенно облегчает работу в избранном направлении бионеорганической химии и делает ее более целенаправленной. Этому также способствует издание с 1970 г. журнала «Journal of Bioinorganic Chemistry», «Journal of Trace Elements in Medicine and Biology» (с 1986), «Микроэлементы в медицине» (с 2000 г.), «Metallomics» (с 2009 г.), других периодических изданий в этой области.

Было создано несколько национальных и международных организаций, координирующих работы ученых в области биологии и медицины малых и сверхмалых концентраций элементов, в том числе европейская федерация обществ микроэлементологов FESTEM (Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals). FESTEM – некоммерческая организация, которая была создана в 1997 по инициативе трех национальных обществ микроэлементологов из Италии (AISETOV), Германии (GSM) и Франции (SFERETE). Федерация была официально зарегистрирована в Университете Гренобля. Сейчас в ее состав входит ряд

национальных организаций, в том числе Sociйtй Francophone d'Etude et de Recherche sur les Eйments Toxiques et Essentiels (Франция, <http://sferete.ujf-grenoble.fr/>), Associazione Italiana Per Lo Studio Degli Elementi In Trazzia Negli Organismi Viventi (Италия, <http://www.aisetov.unimo.it/>), Gesellschaft fйr Mineralstoffe und Spurenelemente e.V. (Германия, <http://www.gmsev.org/>), Sociedad Espaola de Bioquйmica Cйnica y Patologica Molecular (Испания, <http://www.seqc.es/es/Sociedad/21/ComisiondeElementosTrazaComiteCientifico/>), Российское общество медицинской элементологии (Russian Society for Trace Elements and Minerals, <http://www.microelements.ru/>). Кроме того, работает Международное общество по изучению и роли малых доз и концентраций этих элементов в организме человека International Society for Trace Element Research in Humans (ISTERH). Перечисленные общественные научные организации вносят весомый вклад в создание единого информационного пространства, объединение усилий ученых разных стран для решения наиболее актуальных задач микроэлементологии и пограничных областей знания. Этому в значительной мере способствуют регулярно организуемые в разных странах, на разных континентах научные форумы, конференции, симпозиумы, на которых подводятся итоги, происходит обмен опытом, формулируются новые задачи на перспективу в исследовании микроэлементов в питании, медицине и биологии. Перечислим только некоторые конференции, которые проводились по этой тематике в последние годы:

- II Международный симпозиум FESTEM, г. Мюнхен, Германия, 2004;
- Симпозиум “Mengen und Spurenelemente”, г. Йена, Германия, 2004;
- I съезд Российского общества медицинской элементологии, Россия, 2004;
- Конгресс ISTERH, г. Бангкок, Таиланд, 2005;
- Международный симпозиум “Selenium in health and disease”, г. Анкара, Турция, 2006;
- 9th International Conference on the Biogeochemistry of

- Trace Elements (ICOBTE2007), Китай, 2007
- III Международный симпозиум FESTEEM “Recent advances in trace element research: from experiments to nutritional and clinical applications in human”, Сантьяго де Кампостела, Испания, 2007;
 - Trace elements in diet, nutrition & health: essentiality and toxicity, Крит, Греция, 2007;
 - II Съезд российского общества медицинской элементологии (РОСМЭМ), г. Тверь, Россия, 2008;
 - 13th International Meeting on Trace Elements in Man and Animals, Пусун-Чили, November 9th-13th, Чили, 2008;
 - 10th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (2009 - ICOBTE), г. Мехико, Мексика, 2009;
 - 3rd International IUPAC Symposium on Trace Elements in Food (TEF-3) 1–3 April 2009 г. Рим, Италия, 2009;
 - 4th International Symposium on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology, June 9-12, 2010, г. Санкт-Петербург, Россия, 2010;
 - 11th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE-2011), Италия, 2011.

Даже фрагментарный анализ материалов перечисленных научных форумов показывает, что практически в каждом из почти 20 обсуждавшихся основных направлений проводимых исследований в последние годы достигнуты определенные успехи. Накопленный учеными разных стран в процессе многолетних исследований объем информации послужил основой для выделения и развития неорганической биохимии [14], металломики [15] и учения о микроэлементах [16]. Тем не менее, проблема остается актуальной и далека от своего окончательного решения.

Ориентироваться в лабиринте накопленной информации междисциплинарного характера и ежемесячно публикуемых новых материалах по проблеме чрезвычайно трудно. Для этого необходимо расчлнить накопленный материал на блоки, провести их анализ и обобщение, хотя бы в

рамках выбранного раздела, соотносясь с определенными пространственно-временными ограничениями, специфичными для каждого иерархического уровня соответствующей биосистемы. Как показывает многовековой опыт естественных наук, именно в такой «пошаговой» стратегии познания, преимущественно на стыке узловых междисциплинарных проблем в их тесной взаимосвязи, заложены основы научного прогресса, эволюции наших представлений об окружающем нас постоянно развивающемся мире, раскрытия его закономерностей и применения полученных знаний для гармоничного, здорового и безопасного существования вида *Homo sapiens* на нашей планете.

Среди вопросов биодоступности и осуществления био-генной роли металлов в организме одним из ключевых является осуществление транспорта этих химических элементов в биосистемах. Она затрагивает в той или иной мере не только такие аспекты, как поступление, накопление и выведение металлов из организма, но и включение в метаболизм и биологические структуры, выполнение ими физиологических функций и регуляцию на различных уровнях организации биологических систем. Весь этот поистине громадный объем информации послужил основой для выделения и развития неорганической биохимии [14, 17], микроэлементологии [15], металломики [16] и учения о микроэлементах [18, 19].

Транспорт металлов в организме никогда не происходит непосредственно в электронейтральном «металлическом» состоянии и редко осуществляется в свободной ионизированной форме. Последнее касается в основном щелочных и, в меньшей мере, щелочноземельных металлов (т.н. «металлов электролитного фона»), участвующих в формировании внутренней среды организма. Этот процесс, вероятнее всего, является одним из факторов эволюции и несет на себе филогенетический груз возникновения жизни и развития живых объектов в водах Мирового океана. Подавляющее же большинство металлов непосредственно при поступлении в организм образуют бионеорганические комплексы с белками, аминокислотами и другими высоко- или низкомолекулярными органическими соединениями. Прочность и специ-

фичность связывания определяет, в конечном итоге, не только саму возможность, но и адресный характер транспорта, биологическое время существования образуемых комплексов, дальнейшую судьбу соответствующих элементов и их роль в клетке и организме в целом.

Основную роль в механизмах переноса металлов, безусловно, играют белки. Металлотранспортные белки относятся к классу металлопротеинов и в организме отвечают за связывание и транспорт эндогенных и экзогенных металлов. Это связывание может иметь различную природу, характеризоваться разными физико-химическими константами и различной селективностью.

При поступлении тяжелых металлов в кровь происходит первичное низкоселективное связывание с сывороточным альбумином, глутатионом и другими лигандами, богатыми сульфгидрильными группами. Как уже отмечено выше, в крови ТМ присутствуют не в виде ионов, а всегда находятся в динамической связи в комплексах с органическими лигандами [20, 21]. Прочность связывания определяется термодинамическими параметрами, и константы связывания различны. Динамический характер связывания металлов с биомолекулами подразумевает «миграцию» иона металла от лиганда к лиганду, от одного центра связывания к другому. Этот процесс приводит к тому, что низкоселективное непрочное связывание металлов с альбуминами или сорбция на поверхности эритроцитов с течением времени сменяется более прочным связыванием со специфическими белками. В таких белках сайты для связывания с металлом достаточно высоко специфичны, соответствуют ему по стереохимическим параметрам (размеру, координационному числу и т.д.), за счет чего константы устойчивости комплексов со «своим» металлом многократно превышают неселективное связывание с другими металлами [22].

К числу специфичных и активно изучаемых белков, одной из основных физиологических функций которых является транспорт металлов, относятся *металлотронеины*. Ведущим стимулом их выделения и дальнейшего интенсивного

изучения явились прикладные задачи токсикологии и экологии тяжелых металлов, вставшие перед мировой наукой около 50 лет тому назад. Глобальное загрязнение воды и суши нашей планеты тяжелыми металлами, массовые отравления населения кадмием и ртутью, потребовали проведения широкого социально-гигиенического и экологического мониторинга, поиска чувствительных и информативных биомаркеров отравлений и заболеваний химической этиологии, раскрытия закономерностей и механизмов их развития, а также создания и внедрения эффективных средств и способов профилактики и лечения поражений. И хотя на этом пути сделано многое, проблема металлотионеинов не только не утратила своей актуальности, но непрерывно раскрывает новые и новые аспекты, особенности и взаимосвязи, о чем свидетельствует неослабевающий интерес к этим белкам, большое количество исследований и публикаций во всем мире.

В интернете доступны более 11000 источников, содержащих данные о разных функциональных особенностях металлотионеинов. Появляется также все больше публикаций о других транспортных белках, ответственных за перенос, распределение, перераспределение, биотрансформацию и выведение из клетки различных соединений, в том числе воды и самых разнообразных анионов и катионов (рис. 1).

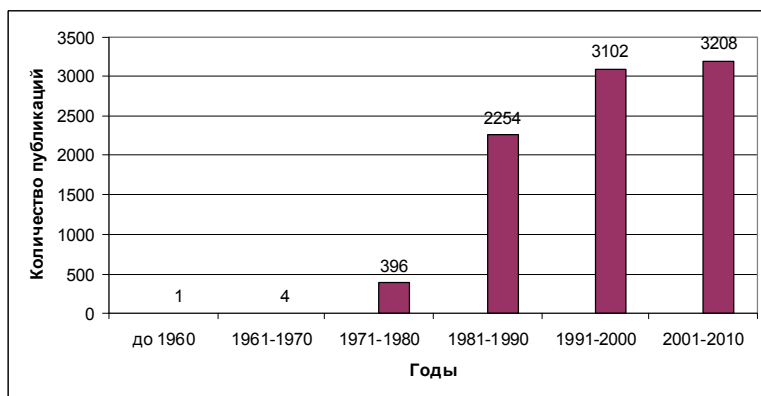


Рис. 1. Количество зафиксированных авторами публикаций в реферируемых журналах по теме «металлотионеины»

Все это свидетельствует о появлении и развитии нового перспективного направления в биохимии и молекулярной биологии – науки о *белках-транспортерах*.

Представляет несомненный научный и практический интерес изучение не только механизмов функционирования этих биологически важных образований, но и их номенклатуры, принципов построения классификаций, в том числе и определение места таких биологически важных транспортных белков как металлотионеины.

Несмотря на большую активность исследователей в развитии данного направления биохимии, молекулярной биологии, генетики, токсикологии и экологии, до сего времени у нас в стране отсутствуют сколько-нибудь полные сводки информации по проблеме металлотионеинов, а материалы регулярно проводимых в разных странах мира научных форумов по ее различным аспектам остаются недостаточно доступными широкому кругу читателей в Украине. Поэтому, руководствуясь соображениями актуальности проблемы, накопленным опытом собственных исследований в данном направлении, а также результатами систематизации литературных данных, авторы взяли на себя смелость в какой-то мере восполнить существующий пробел.

Монография включает четыре раздела:

1. Роль металлов в биологических системах.
2. Металлопротеины и транспортные белки.
3. Металлотионеины в физиологических условиях.
4. Металлотионеины в патологии

При этом хотелось бы подчеркнуть, что изучение металлотионеинов не может рассматриваться изолированно, как с точки зрения их транспортной функции, так и с позиций углубления наших знаний относительно роли эссенциальных металлов в функционировании биосистем, их участии в процессах защиты клеток от ксенобиотиков и детоксикации организма. Поэтому введение относительно небольших по объему двух первых разделов обусловлено необходимостью предварить материал основного, третьего раздела, интег-

рированной информацией о месте и роли тяжелых металлов в биосистемах, с одной стороны, и их основных биологических формах и функциях, носителях и накопителях в организме – металлопротеинах, с другой. Представляется, что это облегчит работу с основным материалом книги. Если эти позиции хорошо известны читателю, первые два раздела при прочтении монографии он может пропустить.

Авторы надеются, что выход монографии будет способствовать привлечению внимания к проблеме изучения металлотионеинов и других металлотранспортных белков, даст в руки исследователей необходимый объем первичной информации, а также ознакомит с методическими подходами для применения в практике токсикологических, биохимических и клинических лабораторных исследований. Работа не претендует на полноту, исследования в данном направлении продолжаются. Все замечания и предложения по теме будут приняты с благодарностью и вниманием.

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

1.1. УЧАСТИЕ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В БИОГЕНЕЗЕ И ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ОРГАНИЗМОВ

Минеральный состав внутриклеточной жидкости, по мнению ученых, подобен составу доисторического моря и строго поддерживается на постоянном уровне (гомеостаз) за счет поступления экзогенных веществ алиментарным и водным путями, а также их вторичного перераспределения между различными органами и тканями [23]. Как подчеркивают В.А. Тутельян et al. [24], мнения ученых относительно биологической значимости элементов периодической системы неоднозначны. Химические элементы (металлы и неметаллы), необходимые организму для построения и жизнедеятельности клеток и внутренней среды организма, называют **биогенными элементами**. Наряду с ними существуют и циркулируют в природной и антропогенно измененной среде условно биогенные, нейтральные и токсичные элементы (рис. 2).

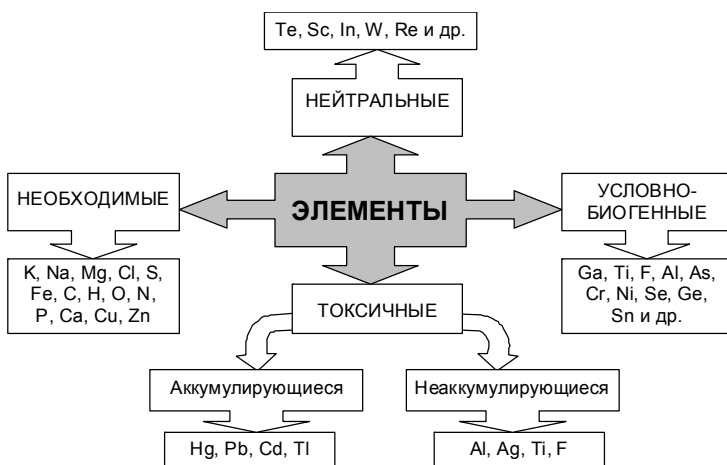


Рис. 2. Деление элементов по степени необходимости для жизнедеятельности организма

Организм для своего существования, роста и развития, продолжения рода и эволюции получает из внешней среды разнообразные макро- и микронутриенты, в том числе и необходимые для жизни микроэлементы. Поступающие в организм современного человека воздух, вода и пищевые продукты являются носителями большого числа пластически и энергетически важных, а также чужеродных химических веществ, обладающих потенциальным токсическим действием. Оценка степени их жизненной необходимости или опасности для здоровья того или иного вещества представляет сложную задачу. Иногда сами эти разграничения условны.

Например, с учетом одного из основополагающих принципов токсикологии «доза – эффект» характерным признаком жизненной необходимости элемента является колоколообразный характер кривой, построенной в координатах «положительное влияние на организм (R) - доза элемента (Д)» [5] (рис. 3).

При недостаточном поступлении элемента из окружающей среды (а) наносится существенный ущерб росту и развитию организма. Одним из проявлений такого эффекта

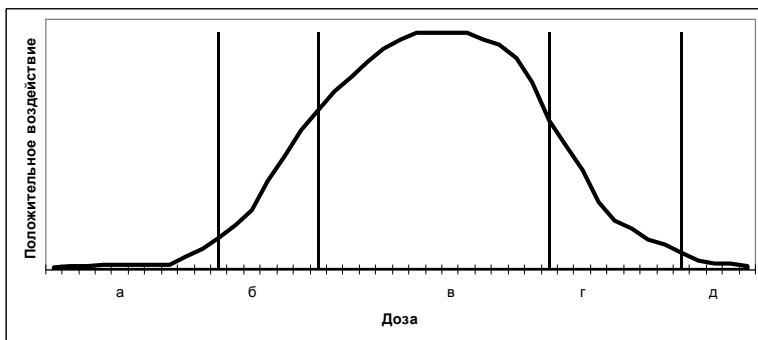


Рис. 3. Кривая зависимости положительного влияния на организм от дозы эссенциального элемента.

может быть снижение активности ферментов, в состав которых входит элемент. При повышении дозы этого элемента (б) ответная реакция организма возрастает, достигает нормы (биотическая концентрация элемента). Чем больше ширина плато (в), тем меньше токсичность элемента. Дальнейшее увеличение дозы (г) приводит к снижению уровня функционирования системы вследствие токсического действия избытка элемента вплоть до ее гибели (д).

Дефицит и избыток биогенного элемента наносят вред организму. Все живые организмы реагируют на недостаток, избыток или неблагоприятное соотношение элементов. К настоящему времени установлена биогенность примерно для 30 элементов. Причем, около 96% массы тела человека приходится всего на 4 элемента (кислород, углерод, водород и азот) [24]. Еще около 4 % составляют макроэлементы: кальций, фосфор, сера, калий, натрий, хлор и магний. Суммарное содержание фтора, железа, цинка, меди, кобальта, марганца, йода и селена (эссенциальные микроэлементы) составляет всего 0,05%.

В терминологическом словаре А.В. Скального и И.А. Рудакова [25], наряду с определением «биогенные элементы», т.е. элементы, необходимые для построения и жизнедеятельности клеток и организмов, приводится также понятие

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

«биотики» (по А.И. Венчикову [26]), которое обозначает экзогенные химические вещества, которые путем вхождения в структуры и системы организма участвуют в физиологических процессах, могут нормализовать их, а также повышать сопротивляемость организма к действию вредных агентов. Авторы считают, что «по характеру действия они относятся в основном к биологическим катализаторам», вероятно, имея в виду вхождение такого рода химических веществ в состав ферментов. Следует подчеркнуть, что такой вариант интерпретации вероятных функций биотиков является упрощенным и весьма суженным, поскольку экзогенные вещества участвуют в формировании структурных элементов клеток, органов и тканей, метаболизме клеток, выполняют многочисленные исполнительные и регуляторные физиологические функции. Вероятно, такое ограничение было введено А.В. Скальным [27], чтобы выделить еще одну биоактивную категорию микроэлементов – «элементов-медиаторов», которые «в ничтожно малых количествах» принимают «непосредственное участие в самом ходе жизненных процессов, в обмене веществ в организме, в основе которого лежат ферментативные процессы». Другими словами, значение и этой категории биотических элементов сводится к биокаталитической функции, что, на наш взгляд, не достаточно по охвату многообразия выполняемых микроэлементами функций даже с позиций неорганической биохимии. Последняя, как известно, рассматривает участие неорганических элементов (прежде всего, металлов) в биологических процессах ферментативной и неферментативной природы. Понимание лежащих в основе таких взаимодействий закономерностей необходимо предполагает знание сопряженных атомов и структуры лигандов, что является основой исследования и интерпретации результатов изучения биологических функций и физиологической значимости макромолекул.

В этом плане интересной является позиция Н.А. Улаховича [28], согласно которой вывод о преимущественно каталитической роли тяжёлых металлов правомерен, но не всеобъемлющ, так как они выполняют и другие функции по переносу групп атомов и целых молекул в биосистемах, зак-

реплению молекул в определенном положении, поляризации их и т.п. Наглядной и плодотворной является построенная данным автором таблица с примерами многообразных метаболических функций, которые выполняют металлы в организме человека (табл. 1).

Из приведенных в таблице данных можно получить

Таблица 1

Металлы, играющие важную роль в организме (по Н.А. Улаховичу, [28])

Металл	Координируемый атом	Роль в организме
Натрий	O	Перенос зарядов, передача нервного импульса, формирование внеклеточной среды
Калий	O	Перенос зарядов, передача нервного импульса, формирование внутриклеточной среды
Магний	O	Перенос фосфатов, гидролиз, формирование структуры клеток
Кальций	O	Перенос фосфатов, гидролиз, формирование структуры клеток. Антагонист магния в ферментативных реакциях
Ванадий	N, O	Окислительно-восстановительный катализ в превращениях эфиров, метаболизм железа, фиксация азота
Железо	N, S	Окислительно-восстановительные реакции, транспорт кислорода
Кобальт	N, S	Перенос H- и CH ₃ -групп, реагент в окислительно-восстановительных реакциях, в составе витамина B ₁₂
Марганец	O, N, S	Окислительно-восстановительные реакции, метаболизм жиров, кофактор дыхательных ферментов, фотосинтез
Медь	N, S	Окислительно-восстановительные реакции, метаболизм фенольных соединений, переносчик кислорода в реакциях сшивания коллагена
Молибден	N, S	Окислительно-восстановительные реакции, в ферментах, антагонист меди
Никель	N, S	Стабилизирует структуру ДНК и РНК, структуру рибосом, содержится в уреазе
Хром	O	Участвует в углеводном обмене, кофактор инсулина (глюкозный фактор толерантности)
Цинк	N, S	Входит в состав около 300 ферментов, участвует в гидролизе фосфатов и синтезе РНК

более широкое представление о разнообразии взаимодействий и физиологических функций различных по свойствам и строению микроэлементов. Однако и данная сводка не в полной мере проливает свет на классификационные признаки металлов. Поэтому вопрос о рациональной классификации биогенных и токсичных элементов остается актуальным.

1.2. КЛАССИФИКАЦИИ БИОЭЛЕМЕНТОВ И МЕТАЛЛОВ ПО ИХ РОЛИ В ОРГАНИЗМЕ

Отсутствие единой концепции биологической роли элементов лежит в основе разнообразия их классификаций вообще и металлов в частности. Для построения такой клас-

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

сификации были использованы достаточно многочисленные химические, биологические, геологические маркеры. Так, были сделаны попытки ранжировать и классифицировать металлы по геометрическим параметрам, характеризующим структуру их атомов, кристаллографическим ионным радиусам, поведению в водных и других растворах, способности образовывать ковалентные связи, отнесению катионов металла к жестким либо мягким кислотам Льюиса [29]. Первые, как известно, характеризуются высокой плотностью заряда и электроотрицательностью, а также низкой способностью к поляризации. Образуемые ими стабильные комплексы отличаются преимущественно электростатическим взаимодействием, увеличением энтальпии и низкой способностью к поляризации. К данной группе относятся такие элементы, как, например, алюминий, бериллий, олово, сурьма. Мягкие кислоты Льюиса (ртуть, свинец, серебро) образуют стабильные комплексы с уменьшением энтальпии и преимущественно ковалентным взаимодействием. Ряд металлов (железо, кадмий, кальций, марганец, медь, натрий, никель, кобальт) ведут себя как жесткие либо мягкие кислоты в зависимости от растворителя, стереохимических и электронных факторов. Выявленные особенности имеют важное значение в подведении химического базиса под проблему биологических свойств металлов.

Одновременно продолжают попытки эмпирического распределения элементов по группам, например, по их содержанию в живом организме и формализовано выполняемым ими биологическим функциям. В частности, в Методическом пособии по общей химии под ред. А. В. Жолнина [28] биогенные элементы разделены на три класса (табл. 2).

Приведенные в таблице данные наглядно показывают неравномерность распределения элементов в группах, а также преобладание металлов в номенклатуре биоэлементов второй и третьей групп. Это свидетельствует о высокой биологической активности минорных элементов и широте их использования в природных биосистемах. Однако, введение, например, такого понятия, как «электролитный фон», либо сведение роли микроэлементов к обеспечению активности

Таблица 1

Классификация биогенных элементов по их функциональной роли в организме

Классификационная группа	Элемент	Количество в организме	Функциональная роль
Органогены	C, H, O, N, P, S	97,4% по массе	Являются строительным материалом для органов и тканей
Элементы электролитного фона	Na, K, Ca, Mg	99% общего содержания металлов в организме	Входят в состав органических молекул в виде противоионов (катионов), играют роль электролитного фона
Микроэлементы	Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Fe	< 1% общего содержания металлов в организме	Биологически активные атомы центров ферментов, гормонов (ТМ)

ферментов, явно недостаточно информативно, а иногда и дискутабельно. Наглядность распределения элементов в данном конкретном случае, безусловно, показательна в учебных целях.

Еще одна классификация химических элементов (табл. 3) сделана А.В. Бгат в журнале “Философия науки” [30].

Как видно из приведенных в таблице данных, группировка также достаточно условна, хотя и дает представление о взаимосвязи эволюции биосферы с геологическими процессами на нашей планете.

По геохимическим признакам (содержание элемента в атмосфере, гидросфере, циркуляция в окружающей среде, склонность к локальному увеличению концентраций при добыче полезных ископаемых из литосферы и использовании перерабатывающих технологий) было выделено 22 потенциально опасных металла, способных неблагоприятно воздействовать на биосферу (потенциально опасные). Были проведены аналитические расчеты для соотнесения концентраций металла в земной коре с показателем обогащения им организма животных и растений, составлены ряды токсичности металлов, имеющие целью систематизировать такого рода соотношения [31]. Однако, хотя они и позволили выделить металлы, антропогенное увеличение концентрации которых в атмосфере и гидросфере особенно вредно для эволюции

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Таблица 3

Биогенная классификация химических элементов

Тип	Группа	Название	Примечание
Основные элементы	Первозлементы	Водород, углерод, кислород, азот	Каркасные элементы органических молекул, возникших еще в докембрии. Составляющие большинства аминокислот
		Фосфор, сера	Непременные участники белковых молекул, ДНК и РНК. Создатели первичной, доклеточной жизни
Биогенные	Макроэлементы	Калий, натрий, кальций, магний, хлор, кремний.	Элементы буферной системы первых одноклеточных организмов и клеточного потенциала. Первые элементы скелетного аппарата простейших организмов
	Эссенциальные микроэлементы	Железо, медь, марганец, цинк, селен, молибден, кобальт, йод, хром, фтор.	Включились в метаболизм с возникновением кровеносной системы. Участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. Составляющие коферментов организма
	Условно эссенциальные микроэлементы	Мышьяк, литий, никель, ванадий, кадмий, свинец, бром,	Узкоспециализированная группа элементов, "работающая" не у всех видов организмов. Некоторые входят в состав коферментов
	Брэйн-элементы	Золото, олово, таллий, теллур, германий, галлий	Предположительно, участвуют в проводимости импульсов головного мозга млекопитающих. Очевидно, включились в метаболизм в четвертичном периоде
Абиогенные	Нейтральные	Алюминий, титан, рублидий	Не заняли своего места в метаболизме животных из-за слабой реакционной способности, несмотря на широкую распространенность в литосфере
	Конкуренты	Барий, стронций, цезий	Участвовали в метаболизме морских форм организмов, что и определило их дальнейшую конкуренцию в метаболизме сухопутных видов (ведущую к патологии)
	Агрессивные	Ртуть, бериллий, осмий, висмут	Элементы поздней вулканической деятельности. В связи с тем, что не нашли места в метаболизме организмов, вредны в малых дозах

биосферы, в проблеме их биотрансформации и биологического действия данный подход также оказался недостаточно четким и универсальным. В этом плане само понятие «тяжелые металлы» не несет в себе биологического смысла. Не случайно, поэтому, в свое время, E. Nieboer и D.H.S. Richardson [32] предложили заменить его на классификационные группы «химически и биологически важных» ионов металлов. Эта концепция также не получила в дальнейшем

практического применения. Она не коснулась, в частности, количественных особенностей биологического действия эссенциальных металлов, которые обычно не столь биологически доступны в природных условиях. Ведь содержание этих металлов, например, в гидросфере составляет менее 1 ммоль/м³ воды.

В.А. Тутельян et al. [24] в своем обзоре приводят классификацию микроэлементов W.R. Wolf, который подразделяет их в традиционном ключе на две группы:

1. Микроэлементы, имеющие значение в питании человека и животных: As, Co, Cr, Ca, F, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Se, Si, V, Zn.
2. Потенциально токсичные микроэлементы: As, Ba, Cd, Co, Cr, F, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Pd, Se, Sn, Ti, V, Zn.

Важно отметить, что 10 элементов помещены в обе группы, что еще раз подчеркивает условность деления элементов на эссенциальные и токсичные.

Поскольку среди микроэлементов в основном присутствуют тяжелые металлы, а также так как именно они представляют один из основных объектов исследования в данной монографии, на их классификационных признаках в токсикологии следует остановиться подробнее.

Формально определению **тяжелые металлы** соответствует большое количество элементов. Однако, по мнению исследователей, занятых практической деятельностью, связанной с организацией наблюдений за состоянием и загрязнением окружающей среды, соединения этих элементов далеко не равнозначны как экополлютанты. Поэтому во многих работах происходит сужение рамок группы тяжелых металлов в соответствии с критериями приоритетности, обусловленными направлением и спецификой работ. Так, в ставших уже классическими работах Ю.А. Израэля [33] в перечне химических веществ, подлежащих определению в природных средах на фоновых станциях в биосферных заповедниках, в разделе тяжелые металлы поименованы Pb, Hg, Cd, As (из которых, заметим, мышьяк вообще не является металлом). С другой стороны, согласно решению Целевой группы

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

по выбросам тяжелых металлов, работающей под эгидой Европейской Экономической Комиссии ООН и занимающейся сбором и анализом информации о выбросах загрязняющих веществ в европейских странах, только Zn, As, Se и Sb были отнесены к тяжелым металлам (из них металлами являются лишь цинк и сурьма) [34]. По определению Н. Реймерса [35], отдельно от тяжелых металлов стоят благородные и редкие металлы. В этом списке, соответственно, остаются только Pb, Cu, Zn, Ni, Cd, Co, Sb, Sn, Bi, Hg. В прикладных работах к числу тяжелых металлов чаще всего добавляют Pt, Ag, W, Fe, Au, Mn [36, 37].

Таким образом, по большинству классификаций к тяжелым металлам относятся Pb, Cu, Zn, Ni, Cd, Co, Sb, Sn, Bi, Hg, Pt, Ag, W, Fe, Au, Mn. Именно они являются приоритетными “металлическими” загрязнителями окружающей среды. Источниками их поступления в экосферу являются выбросы в атмосферу промышленных, энергетических комплексов, объектов транспорта, предприятий по сжиганию отходов, сточные воды, содержащих ТМ. Рассеивание и накопление тяжелых металлов в биосфере представляет опасность контаминации и приводит к отравлению или угрозе отравления живых организмов. Разнообразие видов проявляется, в частности, в разной способности различных бионтов к поглощению и накоплению ТМ, что используется экотоксикологами для биоиндикации опасных и критических ситуаций по данному показателю [38, 39].

Интегральное понятие «тяжелые металлы» фигурирует во многих научных дисциплинах и технологической практике, где в это понятие вкладывается нередко разный смысл. На сегодняшний день существует несколько определений понятия «тяжелые металлы», что не способствует взаимопониманию технологов, химиков, врачей и экологов. При этом чаще всего в основу классификации положена **плотность** металла (рис. 4). По этой классификации тяжелые металлы (ТМ) - собирательное название элементов с металлическими свойствами и с плотностью более 5,0 г/см³. К ним относятся медь, свинец, цинк, никель, кадмий, кобальт, сурьма, олово, висмут, ртуть, марганец.

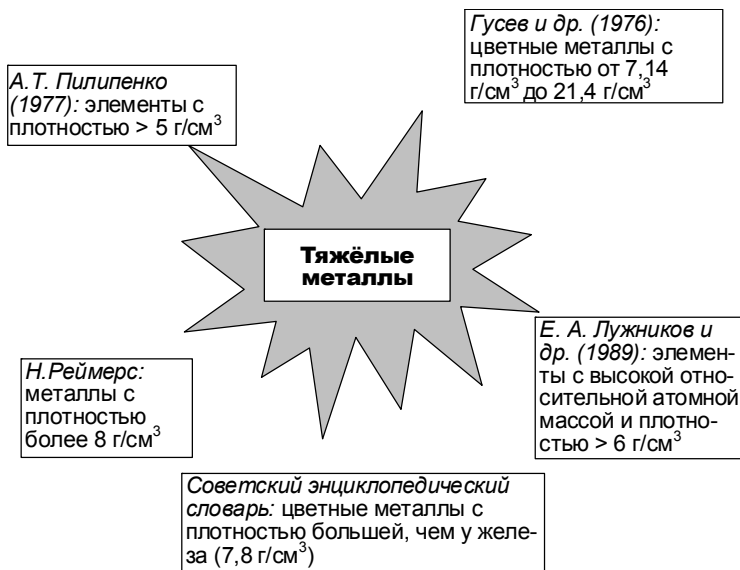


Рис. 4. Классификация тяжелых металлов по плотности.

По Н. Реймерсу [35], тяжелыми следует считать металлы с плотностью более 8 г/см^3 . К этой группе металлов относятся Pb, Cu, Zn, Ni, Cd, Co, Sb, Sn, Bi, Hg. В других работах, посвященных проблемам загрязнения окружающей природной среды и экологическому мониторингу [40, 41, 42], к тяжелым металлам относят более 40 металлов периодической системы Д.И. Менделеева с атомной массой свыше 50 атомных единиц: V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Sn, Hg, Pb, Bi и др., т.е. в основу классификации положена **атомная масса** элемента.

Немаловажную роль в категорировании тяжелых металлов играют следующие присущие им свойства: высокая токсичность для живых организмов в относительно низких концентрациях, способность к биоаккумуляции (накоплению) и биомагнификация (биологическая значимость). Практически все металлы, попадающие под это определение (за исключением свинца, ртути, кадмия и висмута, биологическая роль которых на настоящий момент не ясна), активно участвуют в биологических процессах, входят в состав многих фермен-

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

ТОВ.

По классификации Е.С. Foulkes [43], в группу ТМ включены металлы с молярной массой более 50 г/моль, которые способны к формированию поливалентных катионов. Он исключает из этой группы радиоактивные уран и трансурановые элементы по их токсическому действию, т.к. их воздействие на организм определяется, прежде всего, радиоактивными свойствами. Данный автор делит ТМ на четыре функционально различных класса (табл. 4).

Подразделение тяжелых металлов на классы по биогенным свойствам [43] Таблица 4

Класс	Элемент	Примечание
Класс А	Железо	Является необходимым для жизни в относительно высоких концентрациях
Класс В	Лантан, стронций, и др.	Металлы, для которых биологическая роль не установлена, и которые при низких концентрациях малотоксичны
Класс С	Цинк, медь, никель, кобальт, молибден, и возможно, хром	В ничтожно малых количествах необходимы по крайней мере для некоторых биосистем; при более высоких концентрациях элементы могут стать очень токсичными
Класс D	Ртуть, свинец, кадмий, уран, таллий	Токсичны даже в очень низких концентрациях, биологические функции не установлены

Приведенные в таблице классификационные признаки недостаточно определены («низкие концентрации», «очень низкие концентрации»), что вызывает вопрос о ее применимости для практических целей.

Еще один распространенный принцип деления тяжелых металлов — на токсичные и нетоксичные. Синонимами для обозначения и характеристики металлов второй группы являются понятия «биогенные» и «эссенциальные», тогда как первая трактуется более однозначно.

По степени опасности для здоровья человека все химические вещества, в том числе и тяжелые металлы, в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «Классификация и общие требования безопасности» подразделяются на четыре класса:

- I - чрезвычайно опасные вещества;
- II - высокоопасные вещества;
- III - умеренно опасные вещества;
- IV - малоопасные вещества.

Класс опасности вредных веществ устанавливают в зависимости от количественных характеристик показателей их токсичности и величины гигиенических норм, что может быть проиллюстрировано данными, приведенными в табл. 5.

Таблица 5

Классификация веществ по классам опасности в зависимости от токсикологических показателей [44]

Наименование показателя	Норма для класса опасности			
	I	II	III	IV
ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны, мг/м ³	< 0,1	0,1-1,0	1,1-10,0	> 10,0
Средняя смертельная доза (LD ₅₀) при введении в желудок, мг/кг	< 15	15-150	151-5000	> 5000
Средняя смертельная доза при нанесении на кожу, мг/кг	< 100	100-500	501-2500	> 2500
Средняя смертельная концентрация в воздухе, мг/м ³	< 500	500-5000	5001-50000	> 50000
Коэффициент возможности ингаляционного отравления (КВМО)	> 300	300-30	29-3	< 3
Зона острого действия	< 6,0	6,0-18,0	18,1-54,0	> 54,0
Зона хронического действия	> 10,0	10,0-5,0	4,9-2,5	< 2,5

Отнесение вредного вещества к конкретному классу опасности производят по показателю, значение которого соответствует наиболее высокому классу опасности. Для металла очень важно, в какое соединение он входит.

Для примера приведем несколько металлов и их соединений, относящихся к разным классам:

Чрезвычайно опасные вещества (I): бериллий, диэтилртуть, ртуть (суммарно), кадмий (суммарно), тетраэтилолово, тетраэтилсвинец, этилмеркурхлорид, таллий, полоний, плутоний, протактиний, оксид свинца, растворимые соли свинца.

Высокоопасные вещества (II): кобальт, литий, молибден (суммарно), натрий, свинец (суммарно), стронций (Sr²⁺), сурьма.

Умеренно опасные вещества (III): алюминий, барий, железо (суммарно), марганец, медь (суммарно), никель (суммарно), серебро, хром (Cr⁶⁺), цинк (Zn²⁺), вольфрам.

Необходимо рассмотреть также классификацию металлов по электронному строению атомов, которое, по сути, определяет все их химические, физические, а значит и био-

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

логические свойства их ионов и соединений. Все металлы по этому принципу делятся на четыре группы (табл. 6).

Таблица 6

Классификация металлов по электронному строению

s-металлы	Щелочные металлы: Li, Na, K, Rb, Cs, Fr	Все s-элементы, кроме H и He
	Щелочноземельные металлы: Be, Mg, Ca, Sr, Ba, Ra	
p-металлы	Элементы гр. IIIa, кроме B, а также Sn, Pb, Ge, Sb, Bi	
d-металлы	Непереходные элементы (у которых заполнен d-уровень) Zn, Cd, Hg	Расположены в побочных подгруппах больших периодов периодической системы (кроме лантаноидов и актиноидов)
	Переходные элементы	
f-металлы	Лантаноиды, актиноиды	

Химия d-элементов во многом отличается от химии s- и p-элементов, что связано с наличием большего количества электронных подуровней и возможностью перехода электронов между подуровнями и большей возможностью реализации связей по донорно-акцепторному механизму по сравнению с s- и p-элементами.

1.3. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕТАЛЛОВ

Токсичные элементы – химические элементы, оказывающие отрицательное влияние на живые организмы, которое проявляется только при достижении некоторой концентрации, определяемой природой организма. Существует мнение, что основная причина токсического действия этих элементов обусловлена связыванием определенных функциональных групп (в частности, сульфгидрильных) в белках и других макромолекулах [36], или же вытеснением ионов эссенциальных металлов, например Cu, Zn, из ферментов и иных биоактивных соединений. Особой токсичностью и распространенностью отличаются Be, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, которые конкурируют в процессе комплексообразования с биометаллами и могут их вытеснять из биокомплексов [45].

Оценивая токсичность и опасность металлов, необходимо помнить сохранившее свою безупречность в научно-практическом отношении концептуально важное определение выдающегося врача Средневековья Парацельса (Филип-

па Аурела Теофраста Бомбаста фон Гогенхейма, 1493-1541): «Все есть яд, и ничто не лишено ядовитости; одна лишь доза делает яд незаметным», которое неустанно напоминает молодым токсикологам Исаак Михайлович Трахтенберг [46]. Далее он уточняет: «Но можно сказать и иначе: нет ядовитых веществ, а есть ядовитые их количества».

В то же время из сравнения концентраций основных эссенциальных и токсичных элементов в организме после отравления ТМ следует закономерный вопрос: если причиной металлотоксикозов является вытеснение эссенциальных металлов из металлоферментов и других биоконплексов, то почему это приводит к столь трагичным последствиям при несопоставимых количествах? Ведь даже в случае острых отравлений количество токсичного металла (свинца, кадмия или ртути) в сотни раз меньше, чем цинка, меди и десятки раз - чем марганца. Тем более, как неоспоримо доказано многочисленными исследованиями, не только токсичные элементы, но также избыток или недостаток эссенциальных элементов могут вызвать значительные изменения динамического равновесия биологических систем, приводящие к развитию патологии [20].

Повреждающее действие токсичного вещества (в т.ч. тяжелого металла) проявляется на различных структурных уровнях: молекулярном, клеточном, органном, организменном. Наиболее важные аномальные эффекты происходят на молекулярном уровне: ингибирование ферментов, модификация и конформационные изменения макромолекул и, как следствие, изменение скорости метаболизма и синтеза, генотоксические проявления. Механизмы биохимического действия зависят от дозы (концентрации) вещества.

Дозы могут быть качественно подразделены на категории по степени возрастания эффекта:

1. без заметных эффектов;
2. стимуляция;
3. терапевтический эффект;
4. токсический или повреждающий эффект;
5. гибель организма.

Имеют место также парадоксальные эффекты в проявлении токсических свойств металлов (как и других химических соединений), когда принцип «доза-эффект» нарушается [47, 48]. Причем, отдельные категории и виды эффектов могут не наблюдаться при действии некоторых веществ.

1.4. ПОСТУПЛЕНИЕ, РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И БИОДЕГРАДАЦИЯ СОЕДИНЕНИЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ОРГАНИЗМЕ

Выше было показано, что металлы входят в качестве облигатных компонентов во все без исключения организмы биосферы Земли. Согласно биогеохимической теории Вернадского, существует «биогенная миграция атомов» по цепочке: воздух > почва > вода > пища > человек, в результате которой практически все элементы, находящиеся во внешней среде, в больших или меньших количествах поступают в организм. Они связываются, транспортируются в органы-мишени, подвергаются биотрансформации, участвуют в клеточном и тканевом метаболизме, проявляют определенные биологические свойства и осуществляют физиологические функции, накапливаются в клетках и тканевых депо, вызывают патологические нарушения при отклонении от соответствующих норм. Хорошо известно, что для белкового, углеводного и жирового обмена веществ необходимы Fe, Co, Mn, Zn, Mo, V, B, W; в синтезе белков участвуют Mg, Mn, Fe, Co, Cu, Ni, Cr, Zn, в кроветворении – Fe, Co, Ti, Cu, Mn, Ni, Zn; в осуществлении дыхательной функции и обеспечении организма кислородом - Mg, Fe, Cu, Zn, Mn и Co. Ионы цинка и марганца участвуют также в формировании спиральной структуры РНК. Все это показывает, что металлы, несмотря на их малые концентрации в организме, выполняют целый ряд жизненно необходимых функций.

Поведение металлов в организме зависит от действующих доз и концентраций, от химической формы, путей поступления в организм, накопления, вторичного перераспределения и, наконец, выведения, общего состояния здоровья на момент контаминации тяжелыми металлами, режима питания и водопотребления, а также множества других, в том

числе и недостаточно изученных факторов.

С процессом поступления и накопления микроэлементов в организме тесно связана система их элиминации. В желудочно-кишечном тракте блокируется всасывание микроэлементов (с последующим их выведением с калом). Всосавшиеся в кровь микроэлементы, проходя через печень и почки, выводятся с мочой, желчью, потом либо депонируются в органах и тканях. Они характеризуются свойственным практически каждому химическому веществу и соединению периодом полувыведения ($T_{0,5}$). Этот показатель имеет важное значение для токсикологии металлов, определяя их кумулятивные свойства и другие параметры токсичности [49, 50].

Как правило, избыток металлов накапливается в цитозоле, где они образуют устойчивые комплексы с особыми низкомолекулярными белками. Дальнейшее субклеточное распределение металлов в известной мере является показателем эффективности процессов перевода металлов в нетоксичную форму [51].

Соединения металлов обладают способностью избирательно накапливаться в определенных органах и длительно задерживаться в них. Такие органы получили название **органов-мишеней**. Например, для неорганических соединений кадмия и ртути к таковым относятся почки [55], для свинца и стронция – кости [52]. В процессе биотрансформации может происходить изменение тропизма, как это видно на примере соединений ртути: если для соединений неорганической ртути основной мишенью являются почки, то вследствие происходящего частичного метилирования этого металла происходит образование органических соединений, которые способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и накапливаться в тканях мозга [55].

Механизмы, с помощью которых метилртуть (MeHgCl) преодолевает гематоэнцефалический барьер, изучали на белых крысах [53]. Было показано, что одновременное внутривенное введение L-цистеина с MeHgCl повышает захват последней тканями мозга. Так как комплекс L-цистеина с

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

MeHgCl подобен L-метионину, который является субстратом для L-лейцин-специфичной системы транспорта аминокислот, этот транспортер может быть вовлечен в процесс накопления в мозгу MeHgCl. Для проверки этой гипотезы авторы применили технику ускоренной каротидной инфузии у анестезированных крыс. Зависимость накопления ^{203}Hg в мозгу после инъекции Me ^{203}Hg -L-цистеинового комплекса оказалась нелинейной (с характеристикой насыщающего транспорта с константой Михаэлиса 0,39 ммоль/л при максимальном объеме 33 нмоль/(г·мин)). Медленное не насыщающее накопление комплекса ингибировалось метионином и аминокислотным аналогом 2-амино-дицикло[2,2,1]гептан-2-карбоксильной кислотой (ВСН). Оказалось, что именно субстрат L-системы, а не α -метиламиноизомасляная кислота, является предпочтительным для системы аланина, а также выступает как ингибитор накопления MeHgCl. Более того, транспорт L-[^{14}C]-метионина ингибировался комплексом MeHgCl-L-цистеин, но не ингибировался метилртутихлоридом. Существенный рост накопления в мозгу ^{203}Hg отмечен при инъекции Me ^{203}Hg -глутатиона. Этот процесс ингибировали L-метионин и ВСН, но не ингибировал D-метионин. S-этилглутатион также существенно снижал захват ^{203}Hg тканями мозга после введения Me ^{203}Hg -глутатиона, но не влиял на накопление Me ^{203}Hg -L-цистеина.

Полученные результаты представляют интерес в плане изучения механизмов преодоления ртутью гематоэнцефалического барьера в комплексе с цистеином с вовлечением в этот процесс системы транспорта L-аминокислот. Вероятно, само содержание того или иного металла в биосистемах определяется степенью и количественными характеристиками его участия в биохимических процессах и физиологической ролью, Например, пул гемового железа в организме человека вследствие наличия системы рециклинга остается достаточно стабильным, а Na, K, Ca, Mg и ряд других металлов требуют постоянного пополнения, осуществляемого алиментарным путем.

Тяжелые металлы и их соединения могут поступать в организм человека через легкие, слизистые оболочки, кожу

и желудочно-кишечный тракт. У больных в процессе лечения к этому добавляется ряд путей введения в составе лекарственных препаратов (подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутрибрюшинно и т.п.). Механизмы и скорость проникновения ТМ через разные биологические барьеры и среды зависят от множества факторов, среди которых доминируют физико-химические свойства указанных веществ, химический состав и условия внутренней среды организма.

В результате взаимодействий между поступившими в организм металлами или их соединениями и химическими компонентами различных тканей могут образоваться новые соединения металлов, обладающие иными свойствами и по-другому ведущие себя в организме. При этом в разных органах, вследствие особенностей обмена, состава и условий среды, пути превращения исходных соединений металлов могут быть различными. Отдельные металлы могут избирательно накапливаться в определенных органах и длительно задерживаться в них. Накопление металла в том или ином органе может быть или первичным, или вторичным [54, 55]. Это означает, что при поступлении в организм в течение нескольких часов наблюдается первичное распределение – металл транспортируется в органы-мишени, подвергается перекомплексообразованию, некоторая его часть выводится, но некоторое количество накапливается в тканевых депо.

Так, для свинца, стронция тканевым депо выступает костная ткань, для ртути и кадмия – ткани почек (рис. 5). Из рис. 5 видно, что концентрация ртути в почках в 50 раз превышает концентрацию в печени.

При наличии ТМ в тканевых депо концентрация этих элементов в крови и моче находится в пределах токсикологической нормы. Однако, при изменении внешних условий (детоксикационная терапия - хелатирование, изменение режима питания (недостаток кальция или белковой пищи), голодание, менопауза или беременность у женщин и многие другие причины), возможен выход металла из тканевых депо, его повторное попадание в кровь и вторичное распределение в органы. В нашей лаборатории мы наблюдали рост

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

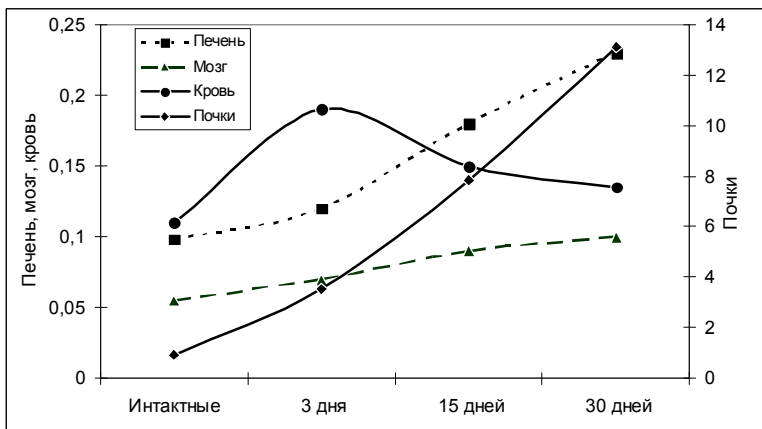


Рис. 5. Зависимость среднего содержания ртути в различных органах крыс после ежедневного внутрижелудочного введения нитрата ртути в дозе 0,1 мг/кг (по металлу) от длительности экспозиции, мкг/г.

содержания свинца в крови беременных женщин выше среднепопуляционных значений [56], а также ухудшение состояния пациентов с ранее (несколько лет назад) диагностированными отравлениями ртутью при проведении «профилактических курсов детоксикационной терапии». При этом содержание ртути в крови (нормальное до начала лечения) резко возрастало, и пациенты жаловались на симптомы, характерные для острого отравления ртутью [55].

Несмотря на повышенный интерес к проблеме токсического действия тяжелых металлов (о чем свидетельствует большое количество опубликованных работ), многие аспекты этой сложной проблемы остаются недостаточно изученными. Особенно это касается механизмов токсикогенеза. К сожалению, многие работы носят констатационный характер. В них рассматривается влияние различных соединений и доз тяжелых металлов на отдельные биохимические, морфологические либо физиологические показатели, а причины, условия, взаимосвязи наблюдаемых явлений, механизмы взаимодействия металлов с рецепторами, другими металлами и функциональными структурами не рассматриваются и не учитываются [57].

Исследуемые биообъекты чрезвычайно гетерогенны. Здесь и различные лабораторные животные (мыши, крысы, кролики, морские свинки и др.), альтернативные модели (низшие организмы, культуры клеток, перфузируемые органы), а также эпидемиологические и клинко-физиологические наблюдения среди населения (представителей «вредных» профессий, контингентов, проживающих в экологически неблагоприятных регионах земного шара, лиц различного пола, возраста и т.п.). Это существенно затрудняет анализ и обобщение полученной разнородной информации.

Несмотря на прогрессивный рост числа публикаций, так или иначе объясняющих механизмы действия микроэлементов, вопрос об общем и частном (индивидуальном) в биологии и токсикологии ТМ не решен. Взгляды биохимиков, токсикологов, врачей-клиницистов на эти механизмы значительно менялись с получением и накоплением новых знаний. Сегодня пересматриваются такие основные этапы поведения ТМ, как:

- связывание ТМ с высоко- и низкомолекулярными компонентами крови;
- транспорт к органам-мишеням;
- пути проникновения в клетку;
- механизмы повреждающего действия на синтез и функционирование белков в клетке;
- взаимодействие ТМ с клеточными мембранами;
- связывание с рецепторами;
- процессы биодegradации комплексов ТМ с природными высоко- и низкомолекулярными веществами;
- механизмы выведения ТМ.

Кроме того, не ясны особенности взаимодействия и взаимовлияния токсичных и эссенциальных металлов, не выяснены до конца причины микроэлементозов и др. Прогресс в понимании процессов связывания металлов с природными высоко- и низкомолекулярными веществами позволит решить ключевые теоретические и многие прикладные проблемы микроэлементологии и токсикологии тяжелых

металлов.

Особую проблему представляет накопление в организме человека токсичных металлов (например, свинца в костях, кадмия и ртути в почках). Она затрагивает многочисленные вопросы носительства тяжелых металлов, когда в течение длительного периода, на протяжении многих лет, а иногда и всей жизни, эти опасные для организма элементы ничем себя не манифестируют. Это существенно затрудняет ретроспективное определение источников поступления экотоксикантов в биообъекты. Использование в указанных целях наиболее чувствительных организмов–биоиндикаторов и соответствующих биомаркеров способствует решению данной сложной задачи.

С этой проблемой тесно взаимосвязан вопрос о патогенезе интоксикаций ТМ в связи с политропным характером токсического действия, наличием индивидуальных и групповых особенностей, число которых возрастает по мере расширения и углубления проводимых исследований.

В последние годы, например, все большее внимание уделяется агрегатному состоянию вдыхаемых с воздухом и поступающих с другими источниками металлов. Так, показано [58], что одним из потенциальных механизмов повреждения, вызываемого вдыхаемыми с воздухом частицами пыли, является генерирование оксидантов находящимися в этих частичках металлами. Из собранных на фильтрах со станции мониторинга проб получали водный экстракт и осадок. Генерирование оксидантов измеряли по образованию малонового диальдегида в реакции с тиобарбитуровой кислотой после обработки клеток растворимой и нерастворимой в воде фракциями. Затем определяли выход интерлейкина-8 из культуры клеток легочного эпителия после инкубации с обеими фракциями металлов. На конечном этапе вводили эти фракции на 24 ч крысам и определяли содержание нейтрофилов и белка в промывных водах.

Исследования подтвердили, что нерастворимая фракция также является источником металлов, обладающих биологической активностью, хотя и менее значимой, чем раство-

римая. В первую очередь, это касается растворимых соединений металлов, которые легко вызывают биологические эффекты и обладают токсическим действием. Так как значительная часть металлов находится в нерастворимых соединениях, была выдвинута гипотеза, что каталитическая активность металлов в частичках пыли не эквивалентна активности их водорастворимых соединений в тех же концентрациях [59]. И хотя общепризнано, что оксидативный стресс является одним из универсальных механизмов металлотоксикозов, многие аспекты его развития и лежащие в его основе молекулярные механизмы в разных типах клеток, органах и тканях требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, проблема поступления, распределения и биodeградации соединений тяжелых металлов в организме человека и других биообъектах сохраняет свою актуальность и активно разрабатывается практически во всех странах мира. Она корреспондирует, прежде всего, с поведением в биосистемах эссенциальных металлов, поскольку именно они обеспечивают оптимальное протекание практически всех процессов жизнедеятельности организма человека и животных, растений и микробов, обитателей суши и моря. Изучение такого рода взаимодействий тесно связано с проблемой транспорта микроэлементов и является одним из ведущих и перспективных направлений металломики, экспериментальной и клинической токсикологии металлов [60, 61, 62].

1.5. МЕТАЛЛЫ В БИОСРЕДАХ

Вопрос о физиологически обусловленном («нормальном») содержании микроэлементов в организме, клетках, органах и тканях человека является сложным. Колебания содержания одних элементов в достаточно широком диапазоне доз и концентраций не приводят к патологическим изменениям, в то время как даже незначительное превышение или недостаток других очень опасны. Набор, уровни и соотношение эссенциальных микроэлементов является характерным признаком вида. Для человека содержание металлов в крови зависит от ряда условий: возраста, пола, времени года

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

и суток, условий труда, вида трудовой деятельности человека, а также различных физиологических (беременность, лактация) и патологических состояний. Наиболее полно (по отношению к другим микроэлементам) изучены показатели биодоступности, транспорта, функциональной активности для таких эссенциальных металлов, как Zn, Cu, Fe, Mn, накапливаются данные о физиологической роли Co, Cr, Mo, Ni, V и др. [18].

Это может быть отчетливо проиллюстрировано, в частности, на примере меди. Биологическая роль Cu всесторонне исследована за последние десятилетия [63]. Медь служит кофактором несколькими важными ферментам, включая цитохром-С-оксидазу (в митохондриальной электронтранспортной цепи), СОД (элемент антиоксидантной системы защиты клеток от АФК) и лизилоксидазу, которая является необходимой для сетеобразования при соединении основных структурных соединительнотканых белков коллагена и эластина. Медь также является жизненно важным элементом для функционирования мозга. Помимо цитохром-С-оксидазы, которая является существенным звеном для пополнения энергии в мозге, медь обнаружена в дофамин- β -монооксигеназе, важном ферменте в цепи синтеза катехоламинов, и в пептидил- α -амидирующей монооксигеназе, которая модифицирует ряд пептидов, выполняющих в ЦНС функции медиаторов [64]. В то же время ионы меди при определенных условиях являются активными генераторами свободных радикалов, которые определяют токсичность меди в случае разрушения гомеостатических механизмов [65]. Все организмы эволюционно выработали целый ряд механизмов, обеспечивающих безопасный транспорт и распределение в меди организме, а также удаление ее избытка. Детали молекулярного взаимодействия этих гомеостатических механизмов становятся все более понятными.

Накопленные данные отражают развитие в историческом плане представлений о биологической роли (биодоступность, обмениваемый пул, физиологические функции, биотрансформация), взаимодействие и взаимовлияние в биосистемах, дозо- и время-эффектные соотношения с выводом

об относительности понятий «эссенциальный» и «токсичный». Весь этот поистине громадный объем информации послужил основой для выделения и развития бионеорганической химии [14], металломики [15] и учения о микроэлементах [16].

Так как цинк и медь входят в состав металлотионеинов и рассматриваются в основном разделе данной монографии, представляло интерес предварительно проанализировать основные положения по физиологическим функциям, транспорту и влиянию на биосистемы избытка и дефицита другого эссенциального металла — железа, для которого все перечисленные позиции наиболее полно освещены, аргументированы и систематизированы. Они могут также служить материалом для сопоставления соответствующих позиций, как в отношении конкретных металлов (Zn, Cu, Fe), так и транспортных белков. Последнее особенно важно, исходя из актуальности изучения закономерностей поддержания гомеостаза отдельных микроэлементов и их совокупности с учетом сложности и динамизма лежащих в основе их взаимовлияния механизмов.

Взаимодействие между эссенциальными металлами известно давно [66]. В экспериментальных исследованиях установлено несколько временных периодов развития и жизнедеятельности организма, когда содержание Zn, Cu и Fe в тканях спонтанно (без видимых внешних причин) существенно изменяется [67]. При этом обнаружены наиболее значительны колебания уровней Cu (в почках на 40, в печени – на 80 и в мозге на 350 %), промежуточные значения у Fe (в мозге на 35, в печени на 80, в почках – на 100, в селезенке – на 200 %) и наименее выражены — у Zn (относительно стабильный уровень в печени и почках за весь период наблюдения, а в мозге колебания на ± 35 %).

При нагрузке мутантных мышей (toxic milk mouse) медью, ее уровень быстро и существенно возрастал в печени, почках, головном мозге и селезенке по отношению к обычным интактным животным [68]. У последних пероральное повторное введение Cu с пищей в дозах 300 мг/л в течение

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

3-х месяцев не изменяло содержания Zn, Cu и Fe в тканях печени, почек и головного мозга. У мутантных мышей нагрузка медью приводила к быстрому росту ее содержания в селезенке и мозге при сохранении исходно высокой концентрации в печени. Концентрации Fe в почках удваивались преимущественно за счет повышенного гемолиза эритроцитов, тогда как содержание Zn в печени было существенно ниже, чем у животных контрольной группы.

У людей нарушения гомеостаза Cu и Fe в мозге приводят к развитию заболеваний нервной системы [69], изучение молекулярных генетических механизмов которых позволит существенно повысить эффективность терапевтических мероприятий.

В основе взаимодействия эссенциальных металлов лежат клеточные механизмы. На различных стадиях развития организма, обмена микроэлементов, на разных этапах биотрансформации этих элементов ведущая роль принадлежит разным видам клеток [70]. Процесс начинается со стадии поступления соответствующих металлов из кишечника в кровь, в котором наибольшее значение имеют энтероциты, затем происходит стадия первичного накопления и распределения металлов с участием гепатоцитов, ассимиляции и специфического использования эритроидными клетками (для Cu и Fe) и возвращающими в круговорот запасы гемового железа ретикулоэндотелиальными макрофагами. Речь идет скорее о направлении процесса поддержания гомеостаза соответствующих микроэлементов в организме, чем о лежащих в его основе механизмах, которые еще предстоит детально изучить.

Механизмы поддержания гомеостаза микроэлементов в организме изучены недостаточно. Вероятнее всего, в них участвует ряд регуляторных и исполнительных элементов, обеспечивающих физиологическую реактивность организма. В частности, имеется множество доказательств нейровегетативной и гормональной регуляции микроэлементного состава клеток, органов и тканей. Так, например, в поддержании внутриклеточного гомеостаза Cu и Zn важную роль иг-

рает альдостерон. Для изучения влияния Zn на этот процесс были поставлены опыты на белых крысах, у которых предварительно была отработана модель альдостеронизма [71]. Как известно [72], альдостеронизм сопровождается изменением баланса Ca и Mg, нарушением усвоения Na из пищи. Происходит также повышенное выделение Zn из депо и его перемещение к поврежденным тканям, включая сердце. В механизме дисгомеостаза Zn у крыс могут лежать несколько причин. Авторы вводили крысам альдостерон в смеси с NaCl (ALDOST) и исследовали роль ацидификации мочи в развитии гиперцинкурии, а также применяли ингибитор карбоангидразы ацетамидазол (75 мг/кг), способствующий стимуляции выведения HCO_3^- с мочой. Для оценки уровня Zn в миокарде изучали цитозольный свободный Zn в кардиомиоцитах и митохондриях. Было также изучено влияние введения ZnSO_4 (40 мг/день) на оксидативный стресс и сердечную патологию. Сравнение контроля и крыс, получавших 4 недели ALDOST, показало следующее: 1. Снижение pH мочи и метаболический алкалоз сопровождался увеличением выведения Zn с мочой, гипоцинкемией и гипокальциемией; эти явления предотвращались введением ацетамидазола. 2. Повышение содержания Zn в миокарде, включая его уровень в цитозоле кардиомиоцитов и митохондриях, коррелировало с увеличением уровня 8-изопростана, малонового диальдегида и каталитической субъединицы НАДФН-оксидазы (gp91), одновременно с окислительным стрессом в плазме и моче; 3. ZnSO_4 предотвращал гипоцинкемию, но не гипокальциемию, а также уменьшал окислительный стресс и появление микроскопических рубцов, не предотвращая васкулита, периваскулита и склероза внутренних коронарных артерий. Таким образом, гиперцинкурия, вызванная ALDOST, сопровождается усилением процессов закисления мочи. Окислительный стресс в миокарде сопровождается увеличением тканевого Zn, служащего антиоксидантом. Применение ZnSO_4 уменьшало некроз кардиомиоцитов.

Мы привели данный пример как яркую иллюстрацию гормональной регуляции процессов гомеостаза ТМ в биосистемах, координирующей работу клеточных регуляторных

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

механизмов на организменном уровне.

Определенное влияние на содержание микроэлементов в биосубстратах оказывают возрастные изменения и биоритмика организма. Так, например, имеют место существенные циркадные изменения концентрации биоэлементов в крови и моче, установлены колебания содержания K^+ и Na^+ в слюне, Ca^{2+} у беременных и Fe в крови женщин в зависимости от фазы менструального цикла [73].

Имеющиеся в литературе данные позволяют оценить роль эссенциальных микроэлементов в протекании практически всех биохимических реакций, направленных на поддержание гомеостаза и адаптивный характер физиологических функций в организме. Вероятно, поэтому в условиях нормальной жизнедеятельности имеет место, с одной стороны, поддержание концентраций большинства микроэлементов в клетке и ее органеллах на относительно постоянном уровне, и в то же время наличие высоких «физиологических допусков», т.е. возможности изменения этих показателей в широком диапазоне величин, с другой.

Для нормального функционирования биологической системы организма необходим постоянный элементный состав, касающийся, главным образом, эссенциальных макро- и микроэлементов, т.е., в системе поддерживается микроэлементный гомеостаз (динамический баланс), поддерживаемый, прежде всего, за счет поступления микроэлементов с пищей.

Как дефицит, так и избыток микроэлементов отрицательно влияют на здоровье человека и вызывают развитие патологических процессов, совокупность которых получила название **микроэлементозы** [19, 74]. Под термином «**микроэлементозы**» понимают заболевания и синдромы, причины развития которых связаны с недостатком или избытком биологически необходимых микроэлементов организме, их дисбалансом, аномальном соотношении макро- и микроэлементов, либо поступлением в организм из окружающей среды заведомо опасных для здоровья элементов, в том числе и токсичных металлов [25, 75].

Дефицит, измененное соотношение микроэлементов в пище или нарушение поглощения металлов в организме могут вызвать гипомикроэлементозы [76]. При разнообразных формах контакта организмов с ТМ возникают болезни и синдромы интоксикации – металлотоксикопатии [77].

Сложность проблемы состоит не только в том, что проявления недостаточности металлов или интоксикации их избытком крайне разнообразны, но и в том, что даже необходимые металлы при определенных условиях вызывают токсические реакции, хотя при других – в определенных дозах и времени экспозиции они оказываются не только полезными, но и необходимыми. Это в полной мере относится к таким наиболее типичным эссенциальным металлам, как железо, медь и цинк [78, 79].

Многое в микроэлементологии, особенно в проблеме дисбаланса микроэлементов в организме, еще недостаточно исследовано [16]. В частности, это касается терминологической неопределенности. Так, в литературе широко используются такие клинические синдромы и нозологические формы, которые объединяются и классифицируются как «металлотоксикозы», «металлопатии», «микроэлементозы» без сколько-нибудь четкого разделения этиопатогенетических и, в частности, токсикологических особенностей этих понятий и феноменов, составляющих содержательную часть таких терминов. Тем более что практически все они предполагают наличие функциональных изменений и патологических нарушений в организме человека и животных, связанных с недостатком, избыточным поступлением, первичным или вторичным дисбалансом биогенных (эссенциальных) или попаданием тем или иным путем токсичных элементов. Интерес к проблеме ученых, врачей, ветеринаров и общественности неуклонно возрастает. Проводится большое число экспериментальных, клинических и теоретических исследований, раскрывающих новые, ранее недостаточно изученные явления, которые по-разному трактуются наблюдавшими их авторами [23], что и приводит к терминологическим разночтениям. Тем более, что информация распылена в большом количестве периодических изданий, нередко недоступных

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

для значительной части исследователей.

Особенно много наработок в отношении микроэлементозов человека. Сделаны достаточно успешные попытки выделить это направление в самостоятельную научную дисциплину – микроэлементологию, и предложена рабочая классификация микроэлементозов [23], представленная на рис. 6.



Рис. 6. Причины и источники микроэлементозов человека

И хотя проблема микроэлементозов выходит далеко за пределы задач данной монографии, один из ее аспектов, связанный с нарушением процессов транспорта металлов в организме, имеет к ней непосредственное отношение. В частности, установлено, что в некоторых биогеохимических провинциях наблюдается избыток или недостаток определенных микроэлементов, не обеспечивается сбалансированное минеральное питание организма, что приводит к возникновению такого рода заболеваний, исходно присущих населению данной территории [80]. Заболевания, вызываемые избытком или недостатком микроэлементов в определенной зоне, называют эндемическими заболеваниями [81].

Некоторые типичные симптомы заболеваний, вызванных недостатком химических элементов в организме – гипомикроэлементозов [82], представлены в табл. 7. И хотя при-

Таблица 7

Характерные патологические проявления дефицита химических элементов
в организме человека

Элемент	Типичные синдромы
Mg	Мышечные судороги
Fe	Анемия, нарушения иммунной реактивности
Zn	Замедление роста, полового созревания, ферментопатии
Cu	Геморрагии, нарушение функций печени, вторичная анемия
Mn	Бесплодие, ухудшение роста скелета
Mo	Замедление клеточного роста, кариес
Co	Злокачественная анемия
Ni	Психические депрессии, дерматиты
Cr	Симптомы диабета
Si	Нарушение роста скелета
F	Кариес
I	Нарушение функций щитовидной железы
Se	Снижение стрессоустойчивости, мышечная слабость, кардиопатии

веденные позиции далеко не исчерпывают наблюдаемые патологические проявления, а тем более, связанные с ними вторичные нарушения, они дают достаточное представление о разнообразии развивающихся при микроэлементозах патологических процессов.

Диагностика микроэлементозов – сложная задача, требующая дальнейшего совершенствования теоретической базы, современного аналитического оборудования и квалифицированных кадров. При этом следует учитывать то важное обстоятельство, что определение содержания микроэлемента в какой-либо одной биосреде не всегда способно отразить содержание его в организме в целом. Так, наиболее полно отражающее микроэлементный статус содержание металлов в волосах не позволяет диагностировать случаи недавнего отравления металлами-токсикантами. С другой стороны, не существует строгих значений содержания микроэлементов в норме [83]. Значения допустимых величин в природных и биологических средах по данным разных авторов отличаются в десятки раз. К тому же при диагностике микроэлементозов редко учитываются соотношения между конкурирующими металлами, что иногда не менее важно, чем их валовое содержание.

Нередко даже при установленном дефиците или избытке микроэлементов в организме коррекция микроэлементозов крайне сложна [84]. Соли микроэлементов плохо усваиваются. Считается, что биологически активной формой пе-

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

реходных элементов являются их комплексы с органическими лигандами. Они легче проходят через клеточную мембрану. Это, с одной стороны, способствует транспорту переходных металлов к сайтам синтеза ферментов в клетках, а с другой — передозировка таких соединений более опасна для организма. Металлы с переменной степенью окисления способны вызывать каскад окислительно-восстановительных реакций, обеспечивая осуществление фундаментальных физиологических функций и выступая в то же время инициаторами оксидативного стресса. Достаточно напомнить в этой связи процесс транспорта кислорода эритроцитами крови, Fe-зависимую активацию перекисного окисления липидов и роль железа в генерировании свободных радикалов в тканях [85].

Значения атомных и ионных радиусов, энергий ионизации, координационных чисел, склонность к образованию связей с одними и теми же элементами в молекулах биолигандов обуславливают эффекты, наблюдаемые при взаимном замещении ионов токсичных и эссенциальных металлов. Может происходить усиление (синергизм) или угнетение (антагонизм) биологической активности замещаемого элемента.

С точки зрения электронного строения ионы d-элементов в степени окисления +2 (Mn, Fe, Co, Ni, Zn) имеют сходные физико-химические характеристики атомов (электронную структуру внешнего уровня, близкие радиусы ионов, тип гибридизации орбиталей, близкие значения констант устойчивости с биолигандами). Сходство физико-химических характеристик комплексообразователя определяет близость их биологического действия и взаимозаменяемость. Указанные выше переходные элементы стимулируют процессы кроветворения, усиливают процессы обмена веществ. Синергизм элементов в процессах кроветворения связан, возможно, с участием ионов этих элементов в различных этапах синтеза форменных элементов крови человека и других биологически значимых процессах.

Как было отмечено выше, для организма характерно

поддержание на постоянном уровне концентраций ионов металлов и лигандов, т.е. металло-лигандное равновесие (металло-лигандный гомеостаз). Нарушение его возможно по ряду причин, среди которых доминируют следующие:

Первая причина. В организм поступают ионы-токсиканты из окружающей среды (Be, Hg, Cd, Pb, Sr и др.). Они нередко образуют более прочные комплексные соединения с биолигандами, чем эссенциальные металлы. В результате наличия более прочных связей и меньшей растворимости образующихся соединений, узлы кристаллической решетки гидроксифосфата кальция $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ взамен кальция могут занимать ионы других металлов, близких по свойствам к кальцию (изоморфизм): бериллия, кадмия, бария, стронция [52]. В этом конкурирующем комплексообразовании за фосфат ион они выигрывают у кальция по показателю прочности связи, устойчивости образуемого комплекса и другим характеристикам.

Присутствие токсичных микроэлементов даже в относительно небольших количествах может вызывать изменения в биосистемах вплоть до патологических нарушений в организме. Не случайно, например, предельно допустимые концентрации тяжелых металлов в питьевой воде [ПДК_в] для соединений кадмия — 0,001 мг/л, бериллия — 0,0002 мг/л, ртути — 0,0005 мг/л, свинца — 0,03 мг/л) [86, 87]. Ионы бериллия нарушают процесс включения кальция в костную ткань, вызывая её размягчение, что приводит к бериллиозу (бериллиевому рахиту). Замещение ионов кальция стронцием приводит к образованию менее растворимого соединения $\text{Sr}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Особенно опасно замещение ионов кальция ионами радионуклида стронция ^{90}Sr . Последний включается в костную ткань и становится внутренним источником облучения, что может приводить к развитию лейкемии и других онкозаболеваний.

Ионы Cd^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} избирательно связывают и блокируют SH-группы лиганда, что лежит в основе отнесения их к «тиоловым ядам» [23] и определяет ведущий механизм развития такого рода микроэлементозов.

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Вторая причина. В организм поступает микроэлемент, необходимый для жизнедеятельности организма, но в более высоких концентрациях, что может быть связано с особенностями биогеохимических провинций соответствующего региона, местности, профессиональной деятельностью, бесконтрольным применением биодобавок [88]. При этом, например, повышенное содержание меди в организме приводит к поражению ряда органов (воспалительным процессам в почках, печени, миокарде, обострению интеркурентных заболеваний).

Болезни, вызванные повышенным содержанием меди в организме, называют гиперкупремиями. У работников с постоянным контактом с медью и ее соединениями возможен профессиональный гиперкупреоз. Избыточное содержание железа в организме приводит к развитию сидероза [80] и т.д.

Третья причина. Нарушение баланса микроэлементов, возможное в результате отсутствия в питании или недостаточного поступления отдельных элементов, также может быть связано с особенностями биогеохимических провинций либо быть производственно обусловленным. Например, недостаток йода в почве и природных водах ряда регионов Украины и других стран вызывает эндемическое увеличение щитовидной железы и зоба у людей и животных [89]. Профилактическое йодирование поваренной соли, применение соответствующих добавок к рациону, способствует предотвращению эндемических заболеваний. Подобные примеры отнюдь не редкость. Избыток фтора приводит к флюорозу. В местах добычи нефти наблюдаются дефицит иона кобальта [90].

Четвертая причина - повышение концентрации комплексообразующих групп (CO, CN⁻, -SH), содержащих азот, фосфор, кислород и серу, способных образовывать прочные связи с ионами биометаллов в нестандартных для организма условиях. При наличии в системе нескольких лигандов, способных к связыванию одинаковых ионов металлов, наблюдаются конкурирующие процессы – конкуренция между лигандами за ион металла. Преобладающим будет процесс

образования наиболее прочного комплекса. Часто таковым является комплекс металла с экзогенным анионом-комплексобразователем.

Пятая причина. Изменения степени окисления центрального атома микроэлементной добавки или изменения конформационной конфигурации биокомплекса, его способности к образованию водородных связей [91].

Проблема лечения микроэлементозов исключительно сложна и многоаспектна. Нами обследованы женщины, у которых после необоснованного применения микроэлементных препаратов имели место функциональные нарушения, которые можно было связать с повышением уровня марганца в крови в 1,7-3,4 раза выше физиологической нормы. Применение препаратов кальция женщинами пенсионного возраста без консультации с врачом для профилактики остеопороза вызывало рост содержания Са в крови на 60-70% выше нормы и у ряда пациенток обостряло течение мочекаменной болезни [88].

Таким образом, перед применением препаратов, содержащих в лечебных дозах микроэлементы, необходимо провести полный анализ крови и волос на содержание эссенциальных и токсичных элементов. И только на основании результатов этого исследования следует решать вопрос о количественном и качественном составе необходимых микроэлементных биодобавок и лекарств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, даже сравнительно краткий и фрагментарный обзор литературы по проблеме биологической роли микроэлементов, в том числе и прежде всего, тяжелых металлов в организме человека и животных, свидетельствует о ее актуальности для решения широкого круга задач профилактического и клинического направлений медицинской науки и практики, требующих объединения усилий химиков и биологов, биохимиков и врачей. Среди них одной из критических является задача раскрытия механизмов связывания и транспорта металлов, которая характеризуется высокой степенью неопределенности и множественностью подходов в связи с

РАЗДЕЛ 1. РОЛЬ МЕТАЛЛОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

тем общеизвестным фактом, что ионы металлов при попадании в организм практически не остаются в ионизированной форме. Они достаточно быстро связываются с различными по природе и свойствам лигандами, среди которых, наряду с аминокислотами, пептидами и другими низкомолекулярными веществами, важное место занимают белковые макромолекулы.

Все многообразие такого взаимодействия может быть в первом приближении приведено к небольшому числу групп, среди которых ведущими являются неспецифическое связывание, нередко приводящее не только к конформационным изменениям, но и денатурации белка; образование комплекса со специфическим апопротеином для осуществления биологических, в том числе транспортных, функций образовавшимся металлопротеином по отношению к строго определенному перечню ионов металлов; вхождение металла в состав синтезируемой *de novo* белковой молекулы, функционирующей как металлофермент. Возможны и другие варианты взаимодействия. Однако практически во всех случаях речь идет об образовании металлопротеинов, предварительное ознакомление с которыми является необходимым условием для понимания принципов построения и свойств специфических металлотранспортных белков, в частности, металлотионеинов.

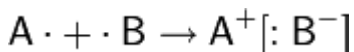
РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

2.1. ОБРАЗОВАНИЕ МЕТАЛЛО-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ

Белки способны соединяться с веществами небелковой природы, образуя с ними комплексы разной степени устойчивости. Такие комплексы принято называть сложными белками. Среди сложных белков выделяют следующие основные классы: гликопротеины, липопротеины, хромопротеины, нуклеопротеины, фосфопротеины и металлопротеины. Белковая часть сложного белка связана с простетической группой химической связью (как правило, ковалентной)

[92]. Пространственная структура сложных белков стабилизирована различными типами взаимодействий, в которых важнейшую роль играют гидрофобные взаимодействия. Кроме того в ее стабилизации принимают участие: ковалентные связи (например, между двумя остатками цистеина — дисульфидные мостики); ионные связи между противоположно заряженными боковыми группами аминокислотных остатков; водородные связи; гидрофильно-гидрофобные взаимодействия. При взаимодействии с окружающими молекулами воды белковая молекула «стремится» свернуться так, чтобы неполярные боковые группы аминокислот оказались изолированы от водного раствора; на поверхности молекулы оказываются полярные гидрофильные боковые группы.

Если образующие химическую связь атомы характеризуются разностью электроотрицательностей, образуется полярная ковалентная связь, при которой общая электронная пара смещается к атому с большей электроотрицательностью. Принято считать, что если химическая связь образуется между атомами, разность электроотрицательностей которых превышает 1,7 по Полингу, то общая электронная пара полностью переходит к атому с большей ЭО. Результатом этого является образование соединения противоположно заряженных ионов:



Между образовавшимися ионами возникает электростатическое притяжение, которое называется ионной связью.

На деле ионная связь между атомами в чистом виде не реализуется нигде или почти нигде, обычно связь носит частично ионный, а частично ковалентный характер. Примером может служить соединение CsF, в котором «степень ионности» составляет 97 %. Ионная связь — крайний случай поляризации ковалентной полярной связи. В то же время связь сложных молекулярных ионов часто является чисто ионной. Важнейшие отличия ионной связи от других типов химической связи заключаются в ненаправленности и ненасыщаемости. При этом сила притяжения описывается формулой $f =$

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

$(e_1 e_2)/(Dr^2)$, где D – диэлектрическая постоянная, а r – расстояние между положительным и отрицательным зарядами.

Связь второго типа – водородная связь — является примером трехцентровой четырехэлектронной связи. Ранее ее образование обычно объясняли действием электростатических сил, не замечая того, что говорят об обычном межмолекулярном диполь-дипольном взаимодействии. Ошибка заключается в том, что электростатические взаимодействия не имеют направленности, следовательно принятие электростатической природы водородной связи также исключает наличие у нее такого важного качества как направленность [93]. В то же время уникальная структура ферментов или двойной спирали ДНК базируется на образовании множества строго направленных водородных связей. Причем цена “ошибки” в данном случае весьма велика (неработоспособность фермента, ошибка в генетическом коде). Природа не могла бы возложить выполнение столь важных задач на химическую связь, имеющую электростатическую природу.

Энергия водородной связи значительно меньше энергии обычной ковалентной связи (не превышает 40 кДж/моль). Однако этой энергии достаточно, чтобы вызвать ассоциацию молекул, то есть их объединение в димеры или полимеры. Именно ассоциация молекул служит причиной аномально высоких температур плавления и кипения таких веществ, как фтороводород, вода, аммиак. Водородная связь в значительной мере определяет свойства и таких биологически важных веществ, как белки и нуклеиновые кислоты. Связь этого типа хотя и слабее ионной и ковалентной связей, тем не менее играет очень важную роль во внутри- и межмолекулярных взаимодействиях. В частности, элементы вторичной структуры (например, α -спирали, β -складки) в молекулах белков стабилизированы водородными связями. Водородные связи во многом обуславливают физические свойства воды и многих органических жидкостей (спирты, карбоновые кислоты, амиды карбоновых кислот, сложные эфиры).

Большинство биоорганических молекул не имеет свободных (не включенных в связи) носителей заряда. Однако

можно рассмотреть ситуацию, когда в белке электронодонорная группа пространственно сближается с электроноакцепторной группой. Донорные и акцепторные фрагменты молекулы удерживаются вместе силами электростатического притяжения. Такие связи называются комплексами с переносом заряда [94].

К третьему виду относятся связи между гидрофобными неполярными группами. Такие группы окружены молекулами воды, взаимопритяжение между которыми сильнее, чем между ними и неполярными группами белка. При этом в состоянии с наиболее низкой энергией образуются скопления неполярных групп и скопления полярных групп воды – «водные айсберги». Связи между неполярными группами такого рода получили название *гидрофобных связей*. Перечисленные типы межмолекулярных связей относятся к числу главных, тогда как промежуточные варианты получили название *промежуточных связей*. Совокупность такого рода связей (электростатических, ионных и ковалентных) обеспечивает существование и функционирование широкого круга биомакромолекул. К таким сложным макромолекулам относятся и металлопротеины.

2.2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ

Металлопротеины – сложные макромолекулы, образованные белком и ионами металлов. Они выполняют в организме широкий круг физиологических функций, участвуют в клеточном метаболизме как биологические катализаторы, компоненты окислительно-восстановительных и энергетических комплексов, осуществляют процессы транспорта, биотрансформации нутриентов, регуляторных молекул и ксенобиотиков, а также обеспечивают выведение шлаков и конечных продуктов жизнедеятельности.

Металлам в этих белках принадлежит важная, а иногда и ведущая роль. Это объясняется особенностями химического строения металлов, что позволяет им образовывать комплексы с малыми молекулами и белками с большим разнообразием связей, и придавать в процессе комплексообразования некоторым из них специфические свойства. Су-

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

щественно изменяются свойства взаимодействующих с металлами лигандов, конформация белковой молекулы (глобулы) и многие другие термодинамические параметры и физико-химические свойства. Поэтому их всестороннее исследование стало предметом изучения многих дисциплин, в том числе интенсивно развивающейся пограничной области – бионеорганической химии, важным направлением которой является исследование условий образования, структуры и функции металлоорганических комплексов с использованием принципов, критериев и методов, принятых в координационной химии металлов.

2.3. ЭЛЕМЕНТЫ КООРДИНАЦИОННОЙ ХИМИИ МЕТАЛЛООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Поскольку, как показано в предыдущем разделе, речь идет о химических основах участия металлов в биологических по своей природе процессах, представляется целесообразным вкратце (вслед за К.Б. Яцимирским [95], Д.А. Букингом [96], Р.Дж. Ангеличи [97], М.М. Джонсом и Дж.Э. Хиксом [98] и др. авторами) остановиться на принципах координационной химии металлов в приложении к биосистемам, так как именно они позволяют токсикологу глубже понять многие закономерности влияния иона-комплексобразователя на конформацию и биологическую активность соответствующих макромолекул и металлобелковых комплексов. Чтобы понять механизмы химических реакций, протекающих с участием металлов, структурные исследования в этой области химической динамики сочетают с кинетическими для оценки изменений реагентов, продуктов и промежуточных интермедиатов, образующихся в переходных состояниях.

Среди общих понятий координационной химии металлов для токсиколога, изучающего взаимодействие белков и металлов, важны такие, как:

центральный атом — атом или ион переходного металла, имеющий свободные электронные орбитали, играющий роль акцептора электронной пары при образовании донорно-акцепторной связи;

заряд иона (первичная валентность) – электровален-

тность иона металла, определяющая общее число отрицательных зарядов, которые должны быть привнесены анионами для формирования электронейтрального комплекса;

координационное число – общее число донорных атомов, присоединенных к центральному атому металла. Координационное число определяется электронным строением центрального атома, главным образом наличием свободных электронных орбиталей, природой лиганда, средой, температурой и т.п.;

лиганды – отрицательно заряженные ионы либо нейтральные молекулы, координирующиеся с центральным атомом комплекса, имеющие в своём составе донорные атомы;

доноры или донорные атомы – атомы, непосредственно присоединенные к металлу, обычно более электроотрицательные, взаимодействующие с металлом путем образования дативной связи — предоставления центральному атому пары электронов с заполненной орбитали;

стереоизомерия металлопротеинов и других бионеорганических комплексов — различное пространственное расположение лигандов вокруг центрального иона металла (конфигурационная – перестановки лигандов при одинаковом химическом составе; конформационная – отличающаяся только углами поворота вокруг связанных пар атомов в том же лиганде);

устойчивость координационных соединений – мера сопротивления комплекса процессу диссоциации. Количественно характеризуется константой устойчивости

$$K_a = [M_n L_m] / [M]^n \cdot [L]^m.$$

Перечисленные позиции определяют координационные свойства и стереохимию комплексных соединений металлов. Так, для комплексов Cu (I), Ag (I), Au (I) и Hg (II) характерно координационное число 2. Из двух возможных конфигураций – линейной и угловой – найдена только первая, так как она обеспечивает минимум лиганд-лигандного отталкивания. Например, при образовании комплексов с остатками аминокислот в белках Ag(I) прочно связывается с аминами и кар-

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

боксильной группами глицина, но очень слабо – с карбонильным кислородом глицилглицина. Перечисленные катионы будут, вероятно, таким же образом связываться и с другими аминокислотами и пептидами. Но уже для Cu (II) возможны координационные числа 4, 5 и 6, а актиноиды могут иметь координационные числа от 5 до 20, особенно с учетом того, что стереохимия определяется не только лигандом и ионом металла, но и температурой, природой растворителя и другими условиями, при которых, например, комплексы Ni (II), Zn (II), Co (II) могут иметь, в зависимости от экспериментальных условий, тетраэдрическую, квадратно-плоскостную или октаэдрическую геометрию [96]. Важно подчеркнуть, что для тетраэдрических комплексов известны только оптические и не возможны геометрические изомеры; для квадратно-плоскостных структур характерна геометрическая и не возможна оптическая изомерия. Все металлофталоцианиновые красители изоструктурны с исходным протонированным основанием, а хлорофилл, витамин B₁₂ и гемоглобин построены на замещенных порфириновых ядрах [96].

Ионы подавляющего большинства металлов, за исключением щелочных, лантаноидов и группы урана, обычно координируют шесть молекул воды. При координационном числе 6 комплексы, как правило, имеют октаэдрическую конфигурацию. Октаэдр имеет высокую симметрию (O_h). К этому показателю близки комплексы Zn (II), Cr (III), Co (III), высокоспиновые комплексы Mn (II), а также комплексы ряда других металлов, такие как Cu (II), Ni (II), Co (II). Такие комплексы проявляют оптическую и геометрическую изомерию.

Следует иметь в виду, что для ряда металлов существуют комплексы с координационными числами 7, 9 и больше 9. Последние встречаются у ионов металлов большого размера, таких как Cs (I), La (III), U (III), Ce (III). Максимальное координационное число (N) можно вычислить, предположив плотную упаковку лигандов на поверхности иона металла, по следующей формуле:

$$N = 2 \pi / (3)^{1/2} \cdot (d/r)^2 / (1-r^2/8d^2)$$

где: d – расстояние металл – лиганд, r – вандервааль-

сов радиус лиганда

Знание N имеет большое значение, поскольку ионы металлов обычно координируют более чем один лиганд. При этом устойчивость комплексов, образуемых сильно электроположительными ионами металлов (Li^+ , Mg^{2+} , La^{3+}) малого радиуса с отсутствием неподеленных электронных пар, в их валентной связи с сильно электроотрицательными лигандами (F^- , O^{2-}) определяется практически исключительно электростатическим взаимодействием. Такие ионы металлов и лиганды называются жесткими кислотами и основаниями, соответственно [97]. Константы устойчивости галогенированных комплексов жестких ионов металлов (класс а), к которым, помимо щелочных и щелочноземельных металлов, относятся такие ионы, как Al^{3+} , Co^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Ti^{4+} , Sn^{4+} и др., понижаются в ряду: $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$. К классу б (мягкие кислоты) относятся ионы Cu^+ , Hg_2^{2+} , Hg^{2+} , Pt^{2+} , Pt^{4+} , Ti^+ , Ti^{3+} и др. Они значительно больше по размеру, имеют более низкие положительные заряды и неспаренные валентные p - и d -электроны, образуют наиболее устойчивые комплексы с такими более тяжелыми донорными атомами лигандов, как P, S, I, имеющими низкую электроотрицательность и высокую поляризуемость, значительный вклад в образование комплексов вносят ковалентные связи. Их константа связывания (K) с галогенидами изменяются в следующей последовательности: $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{F}^-$.

В плане оценки поведения ионов в металлобелковых комплексах следует напомнить также, что существует значительная группа металлов, в том числе двухзарядных переходных (Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Zn^{2+}), свойства которых только частично вписываются в одну из упомянутых групп (а или б), и которые прямо или косвенно корреспондируются с рассматриваемой в настоящей монографии проблемой. Они чаще всего классифицируются как промежуточная группа. Им комплементарны соответствующие лиганды, которые подразделяются на жесткие (например, F^- , Cl^- , OH^- , NH_3), мягкие (I^- , CO , CN^-) и промежуточные (Br^- , NO_2^- , SO_3^{2-}) основания. Такое деление оказалось теоретически доказуемым и практически важным, особенно для описания взаимодействий в

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

биологических системах. Жесткие ионы металлов (например, Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+}) координируются в белках и нуклеотидах главным образом через атомы кислорода фосфатных групп, тогда как более мягкий ион Cu^{2+} координируется как к мягкому атому азота ароматического основания, так и к фосфатной группе.

Однако и свойства лиганда в комплексе не остаются неизменными. Координация с ионом металла или другой кислотой Льюиса существенно изменяет его реакционные свойства, так как образование новой связи за счет свободной пары валентных электронов способствует перераспределению электронной плотности с активированием близлежащих групп атомов. Может меняться конформация белковой молекулы в области данного сайта. Например, ионы металла, связанные серусодержащими лигандами или относительно мягкими порфириновыми кольцами, будут проявлять тенденцию скорее к образованию комплексов с дополнительными мягкими лигандами, чем с гидратированными ионами металла $[Me(H_2O)_6]^{2+}$, которые относятся к жестким лигандам. Комплексы Cr (III), имеют геометрию правильного октаэдра и относят к наиболее устойчивым. Эти комплексы наиболее инертны. В противоположность этому, ионы марганца Mn (II) образуют очень слабые комплексы, легко диссоциирующие в воде до $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$.

Уже более 100 лет назад Меервейн [99] сформулировал следствия, вытекающие из феномена образования металл-белковых комплексов:

- увеличение кислотности атома водорода при донорном атоме;
- облегчение атаки лиганда нуклеофилами и затруднение – электрофилами;
- эффект маскирования некоторых реакций свободного лиганда, зависящих от стерических или электронных взаимодействий, так как они затрудняются или становятся невозможными при координации;
- изменение окислительно-восстановительных свойств лиганда.

Именно влиянием лиганда можно объяснить прочную координацию железом в геме таких мягких лигандов, как CO и CN⁻, а также высокое сродство Fe²⁺ к сере в негеминовых железо-серосодержащих белках [100].

Прочность связи с белком возрастает с увеличением валентности. Так, одновалентные ионы чаще всего вообще свободны. Ионы хлора не связываются с гемоглобином, казеином, пепсином, фибриногеном, но связываются с сывороточным альбумином [101]. Причем, ионы иода связываются в 4, тиоцианатов и трихлорацетата – в 20 раз более прочно, чем ионы хлора. Также более прочно, чем ионы хлора, связываются с альбумином ионы кальция, магния и фосфат-ионы. В мышечном соке с белками связано 40% кальция и значительное количество ионов магния, в сыворотке крови – около 1/3 кальция.

Эти особенности распространяются не только на эссенциальные, но и на токсичные металлы, которые достаточно быстро и легко образуют комплексы с сывороточным альбумином непосредственно после их поступления в кровь. В наших исследованиях этот эффект был подтвержден, в частности, для ртути [21, 55]. Практически с первых минут экспозиции экспериментального животного HgCl₂ в плазме крови определяется только связанная с белками ртуть. Это обеспечивает быструю доставку металла в органы и ткани, причем наибольшее содержание в первые часы отмечается в печени (рис. 7).

Далее происходит включение в процесс транспорта специфических транспортеров, которые осуществляют доставку ртуть-органических комплексов в клетки, где они оказывают свое биологическое действие. Механизмы клеточного транспорта металлов довольно многочисленны и разнообразны по своей природе. Это объясняется необходимостью выполнения металлобелковым или другим подобным комплексом различных функций на разных этапах транспортного процесса. Например, показано, что алюминий (Al) связывается в организме со многими природными транспортерами, такими как аминокислоты, трансферрин, катехоламины [102].

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

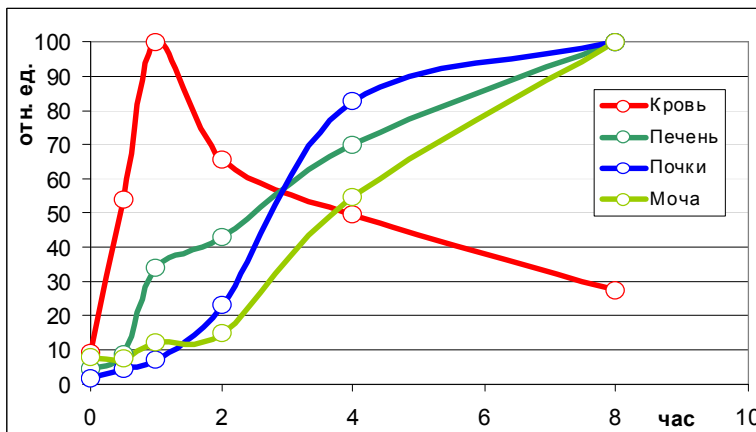
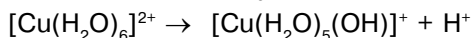


Рис. 7. Зависимость содержания общей ртути в некоторых органах животных от времени (крысы, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ внутрь желудка, остро — 0,1 мг/кг по металлу), отн. ед. [55].

Проведены исследования, в которых изучены особенности транспорта Al в лизосомы [103]. В неэнергетизированных лизосомах pH в матриксе равно примерно 5,2. Поступление в эти органеллы белковых металлокомплексов ведет к активации гидролаз, ответственных в том числе и за процесс выведения избытка металла (например, в эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек). Для большинства трехзарядных комплексов гидролиз ускоряется при pH 3,0, двухзарядных — при pH 5,0-7,0, а однозарядных — при pH > 7,0. Таким образом, с помощью локального изменения pH осуществляется простейшая регуляция концентрации функционально необходимого либо экскретируемых микроэлементов (в данном случае Al).

В зависимости от природы центрального атома металла в комплексе меняются кислотные свойства координированных молекул воды и четвертичного азота. Универсальность этого явления продемонстрирована на разных комплексах. Так, для $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ константа равновесия реакции:



равна $1,07 \cdot 10^{-8}$, что примерно в 10^7 раз выше, чем у свободных молекул воды. Подобное повышение кислотности прослеживается также у органических лигандов, в которых атомы водорода связаны с донорными атомами и группами.

Маскирование реакций лигандов в комплексах с металлом проявляется особенно часто и наглядно в окислительно-восстановительных реакциях, когда эти процессы у координированных лигандов менее интенсивны или вообще не наблюдаются. Этому способствует также такой эффект координации, как фиксация донорных атомов в определенных положениях.

Перечень примеров изменения реакций лигандов, координационных центров комплексов и донорных групп может быть продолжен и расширен. Заимствованные нами из ставших классическими учебных пособий, монографий и обзоров данные по координационной химии металлокомплексов, включая металлопротеины, использованы лишь для целей иллюстрации глубокой конформационной перестройки образуемых за счет новых связей измененных соединений. Причем, существенно расширяется спектр взаимодействий, становятся возможными новые реакции, имеющие важное биологическое значение. Этот материал в значительной мере предваряет и служит основой понимания многообразия функций, выполняемых металлопротеинами в биосистемах, в том числе и в качестве транспортеров для ионов металлов и других микроэлементов.

2.4. ПРИМЕРЫ РАЗНООБРАЗИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНОВ

По своим ведущим биологическим функциям металлопротеины подразделяются на структурные, энергетические, регуляторные, транспортные и каталитические макромолекулярные металлоорганические комплексы. Сам процесс взаимодействия ионов металлов с белками отличается от такового с аминокислотами и пептидами. Прежде всего, такие группы белков, как $\alpha\text{-NH}_2$ и $\alpha\text{-COOH}$ полипептидных цепей разделены ковалентно связанными аминокислотными

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

остатками. На процесс взаимодействия существенное влияние оказывает конформационное состояние пептидной цепи. Даже удаленная от места связывания боковая цепь может принимать участие в образовании хелатного кольца, особенно в металлопротеинах и металлоферментах, в которых сильное взаимодействие между металлом и белком играет специфическую биологическую роль. При проведении исследований в опытах *in vitro* следует избегать работы с буферами из-за конкуренции между белком и буфером за металл, а также возможности образования тройного комплекса (белок-металл-буфер).

Потенциальными местами присоединения ионов металлов к белку в основном являются группы $-NH$ и $-C=O$ пептидной цепи, а также способные к ионизации звенья боковых цепей (чаще всего гетероатомы серина, треонина, цистеина и метионина) [104]. Примером может служить связывание атома железа в цитохроме с атомом серы метионина. В реализации такого взаимодействия белка и металла помимо конформации белка важную роль играют внутреннее сродство металла к координирующим атомам и pH. Если L^- — связывающий центр, а M^{2+} — ион металла, то константы ассоциации этого центра с ионом металла описываются следующими уравнениями:

$$L^- + M^{2+} = LM^+; \quad K_m = (LM^+) / (L^-) \cdot (M^{2+})$$

$$\text{или при } n \text{ таких центрах: } K_m = v_m e^{+2\omega Z \cdot (Zm)} / (n - v_m - v_h) (M^{2+});$$

где: v_m и v_h — число центров, занятых M^{2+} и H^+ соответственно, а K_m — внутреннее сродство каждого из этих центров к иону металла. Член $e^{+2\omega Z \cdot (Zm)}$ — фактор электростатического взаимодействия, Z — остаточный заряд белка, отнесенный к иону металла, а ω — электростатический фактор, обратно пропорциональный ионной силе и размеру молекулы.

Эти уравнения позволяют делать прогнозы относительно вероятного распределения металлов по потенциальным связывающим центрам. Так, можно ожидать, например, что при низких значениях pH ионы Cu^{2+} будут связаны в основном с карбоксильными группами, а при нейтральных перемещаться к имидазольным, что изменяет свойства всего

комплекса.

Неспецифическое взаимодействие ионов металлов с белками, применительно к задачам данной монографии, лучше всего проиллюстрировать на примере Cu^{2+} и Zn^{2+} , поскольку они входят в состав МТН. В соответствии с обобщением, сделанным Е. Бреслоу (Е. Breslow) более 40 лет тому назад [105], имеются характерные отличия в комплексообразовании этих ионов с белками:

- комплексы Zn^{2+} в основном тетраэдрические или октаэдрические, тогда как у Cu^{2+} квадратно-плоскостные либо искаженные октаэдрические;
- координирующиеся атомы по способности связываться соотносятся в последовательности $\text{S} > \text{N} > \text{O}$, однако у Cu^{2+} эта связь примерно в 10 раз прочнее, чем у Zn^{2+} ;
- ассоциация Cu^{2+} с небольшими пептидами характеризуется тенденцией к связыванию с атомами азота пептидной связи и замещению пептидного протона. Увеличение числа доноров электронов приводит к созданию «сильного поля лигандов». При этом главная полоса поглощения сдвигается в более коротковолновую область с 700 нм для комплексов состава 1:1 (α- NH_2 -группа – имидазол) до 515 нм для комплексов, в которых донорами электронов являются α- NH_2 -группа и 3 атома азота пептидных связей. По силе поля лигандов координирующиеся группы соотносятся: $\text{NH}_2 > \text{N}$ пептидной связи $>$ имидазол $>$ O_2 .

При поступлении в кровь эссенциальных и токсичных металлов, они прежде всего связываются с сывороточным альбумином, выполняющим функции универсального неспецифического транспортера. Он представляет собой белок с молекулярной массой 66,5 кДа и содержит, наряду с полным набором других аминокислот, 16 остатков гистидина. Поэтому, при попадании в кровь ионов Zn^{2+} при pH 5,5-7.5 происходит взаимодействие последних с 16 имидазолами боковых цепей в соотношении 1:1. Причем два атома связываются прочнее остальных за счет сильных центров связывания, включающих имидазольную и карбоксильной группы боковой

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

цепи либо карбонильного кислорода пептидной связи. Эти два наиболее сильных центра связывания Zn^{2+} не идентичны таковым для Cu^{2+} , так как высокая концентрация Zn^{2+} не блокирует взаимодействие с Cu^{2+} . При наличии 3-4-х и более эквивалентов Cu^{2+} в сывороточном альбумине был обнаружен слабый центр связывания с максимумом поглощения 375 нм. Предложена структура этого центра, в котором медь (II) связана с SH-группой и находится вблизи от $-S-S-$ связи. Этот центр блокируется реагентами, взаимодействующими с SH-группами. По нашему мнению, следует постулировать гипотезу о различной функциональной значимости этих центров, а также условий высвобождения транспортируемых ионов в области рецепторов (либо сайтов) соответствующих ионов.

Транспорт металлов в организме представляет многоэтапный процесс, в котором помимо сывороточного альбумина принимает участие ряд специфических белков-транспортеров, таких как трансферрин, транскуперин, трансманганин, никелеплазмин, металлотионеин, комплексы которых с соответствующими металлами поступают в клетку путем эндоцитоза.

Необходимо подчеркнуть, что особенности комплексообразования, структуры и свойств металлопротеиновых комплексов играют важную роль в особенностях и специфике проявления ими метаболических, физиологических и других выполняемых в организме функций, что может быть прослежено на примере таких наиболее востребованных в процессе накопления и транспорта металлов в организме человека и животных, как специфические переносчики железа и меди.

Переход субъектов биосферы в процессе эволюции на аэробное дыхание потребовал участия в этом процессе элемента переменной валентности, который мог принимать участие в окислительно-восстановительных процессах, обеспечивать доставку кислорода к тканям и осуществлять регуляторные функции в энергетике клеток. Таким мощным универсальным и одновременно специфичным агентом оказалось

железо, которое способно изменять степень окисления Fe(III)/Fe(II). Поскольку ион Fe(III) чрезвычайно малорастворим [для Fe(OH)₃ $\text{pH} \approx 10^{-36}$], возникла железотранспортирующая система, дифференцированная применительно к особенностям энергетического обмена организмов, стоящих на разных уровнях эволюционного развития. У аэробных микроорганизмов и грибов это – сидерохромы, а у высших животных и человека – трансферрины или сидерофилины. Принципиальная схема функционирования системы однотипна и включает 5 взаимосвязанных этапов:

- биосинтез специфического лиганда для иона Fe³⁺ в ходе ферментативных реакций;
- регуляция ионом железа генетического аппарата, обеспечивающего синтез соответствующих ферментов;
- диффузия лиганда к мембране, поверхности клетки или в среду, связывание иона Fe³⁺ и активный транспорт иона металла в виде его комплексов в клетку;
- накопление комплекса Fe³⁺ в клетке, последующее восстановление и доставка атома железа в требуемое место биосинтетическим аппаратом клетки;
- выведение не связанных с металлом молекул лиганда из клетки во внеклеточную среду.

Система находится во взаимосвязи с процессами поступления железа в организм, биотрансформацией его форм и их депонированием, с выполнением отдельными компонентами пула Fe в организме физиологической роли в разных функциональных комплексах, а также последующими рециклингом и удалением.

Поступление железа в организм происходит путем всасывания его из пищи в кишечнике [106]. Уровень абсорбции Fe в тонкой кишке регулируется потребностью организма, возрастая при дефиците и снижаясь при повышенной нагрузке металлом. Эффективность абсорбции определяется количеством железа, захватываемого энтероцитами кишечных ворсинок и клетками, находящимися в криптах Либеркюна [107]. Процесс контролируется путем изменения уровней

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

экспрессии ряда регуляторных белков, таких как гепсидин (Hr), рецепторы трансферрина (Tf-R1 и Tf-R2) в печени, транспортер бивалентных металлов (DMT1), белок гемохроматоza (HFE), дуоденальный цитохром b (DCytb), регулируемая железом мРНК (Ireg1) и гефестин (Hph) в 12-перстной кишке.

К настоящему времени выделено более 20 белков, принимающих участие в транспорте и клеточном гомеостазе железа. К ним, наряду с ферритином, трансферрином, гепсидином, церулоплазмином, относят и металлотioneин [108, 109]. Как показала И.П.Лубянова в своём обзоре [116], все железосодержащие и железозависимые белки по характеру их связи с этим биоэлементом, а также с учетом их функции можно разделить на четыре группы, в том числе три составляют стабильный пул железа и одна группа – лабильный пул железа (табл. 8)

Самая большая группа ферропротеинов объединяет гемсодержащие белки, включающие приблизительно 2/3 железа. К ним относятся гемоглобин, миоглобин, нейроглобин, циклооксигеназа, NO-синтаза, цитохромы дыхательной цепи (α_1 , α_3 , β_1 , β_5 , c), цитохром P₄₅₀, каталаза, пероксидазы (миелопероксидаза, тиреопероксидаза, лактопероксидаза) и другие.

Таблица 8

Железосодержащие комплексы в организме человека

СТАБИЛЬНЫЙ ПУЛ ЖЕЛЕЗА (связанный с белками)			ЛАБИЛЬНЫЙ ПУЛ ЖЕЛЕЗА
Гемопротеины	Негемовые ферменты	Транспортные и депонирующие формы	Низкомолекулярные комплексы
Гемоглобин Миоглобин Нейроглобин Каталаза Циклооксигеназа NO-синтаза Пероксидазы: миелопероксидаза, тиреопероксидаза, лактопероксидаза. Цитохромы $\alpha_1, \alpha_3,$ β_1, β_5, c Цитохром P450 и др.	НАДН ₂ -дегидрогеназы Сукцинатдегидрогеназа Супероксиддисмутаза Рибонуклеотидредуктаза Оксигеназы, в т.ч. липоксигеназа	Транспортное: β -глобулины трансферрин, лактоферрин, ферритин Резервное железо: ферритин, гемосидерин, α -фетопротеин	Железо, связанное с лигандами: цитратом, АТФ, цистеином Железосерные кластеры: FeS, 2Fe ₂ S, 4Fe ₄ S и др. Аконитаза NO-Fe ²⁺ CO-Fe ²⁺

Гем является конечным продуктом в цепи превращений порфиринов в результате включения Fe^{2+} в протопорфириновое кольцо при участии фермента феррохелатазы, чувствительного к воздействию свинца. Угнетение активности этого фермента нарушает утилизацию железа, и оно может накапливаться, связываясь с другими белками и лигандами.

Следующую группу составляет негемовое железо, включающее железосерные белки и железофлавопротеиды, к которым относятся негемовые ферменты митохондрий, также участвующие в транспорте электронов, но содержащие в своем составе больше железа, чем цитохромы. Эта группа включает НАДН-дегидрогеназу, сукцинатдегидрогеназу, ксантиноксидазу, а также специализированный железосерный белок нуклеинового обмена - рибонуклеотид редуктазу, оксигеназы, в том числе липоксигеназу.

Трансферрин, лактоферрин, ферритин и гемосидерин представляют группу ферропротеидов транспортного и резервного железа, они иммунологически близки и относятся к антигенам широкой межорганной специфичности. Ферритин относят также к опухолевым маркерам или ассоциированным с опухолью антигенам, учитывая свойственную ему иммуносупрессивную активность.

Низкомолекулярные комплексы представлены пулом лабильного железа (ПЛЖ) с такими лигандами как цитрат, АТФ, цистеин и др., железосерные комплексы. В последние годы отмечена высокая аффинность оксида азота (NO) и оксида углерода (CO), которые образуются при участии ферментов NO-синтазы (NOS) и гемоксигеназ (HO), к Fe^{2+} . Комплексы железа с NO и CO влияют на экспрессию железорегулирующего белка (IRP), контролирующего синтез ферритина, трансферриновых рецепторов (ТФР), транспортеров железа (ферропортина и двухвалентного переносчика металлов), а, следовательно, поступление и накопление железа в организме, а также его метаболизм. Высоким сродством оксида азота с лабильным железом и железопротеинами объясняют механизмы регуляции ряда биохимических процессов.

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

Оксид углерода, который образуется в макрофагах в процессе деградации гемоглобина при участии НО, связываемая Fe^{2+} , выполняет антиоксидантную функцию. Известна роль двухвалентных препаратов железа в качестве антидота при интоксикации оксидом углерода. В свою очередь такую же роль, вероятно, играет и СО по отношению к высоко агрессивной форме железа (Fe^{2+}).

Суммируя представленную в обзоре информацию, следует обратить внимание на две важных позиции, относящихся к проблеме взаимодействия эссенциальных металлов при поддержании общего клеточного элементного гомеостаза и его нарушений в процессе токсикогенеза. Эти позиции определяются: 1. влиянием Cu и Zn на уровень поступления и выведения Fe из клетки, ролью церулоплазмينا и металло-тионеинов в клеточном транспорте Fe, а также 2. наличием сложного мультибелкового комплекса, включающего, наряду с транспортными, регуляторные белки и шапероны.

В опытах на беременных крысах экспрессия этих белков существенно возрастала уже на 2-3 сутки гестации, а у крыс, получавших рацион с дефицитом железа, на 6-й день, что сопровождалось ростом процесса абсорбции железа в 2-7 раз, в том числе и в 12-перстной кишке [110]. Трехвалентное железо из пищи в слизистой кишечника превращается в двухвалентное [111]. Показано, что аскорбиновая кислота способствует всасыванию железа в кишечнике и необходима для перевода железа в биологически более активную форму (Fe^{3+} восстанавливается до Fe^{2+}).

После всасывания Fe транспортируется трансферрином в костный мозг, где оно включается в молекулу гемоглобина, который с участием биологического пула железа осуществляет одну из ведущих физиологических функций – доставку кислорода клеткам и тканям. Избыток железа депонируется в печени в виде соединения с запасующими белками – ферритином или гемосидерином [112].

Гемоглобин (Hb) – металлопротеин молекулярной массой 66-68 кДа, относящийся к классу гемопротеидов, в котором белок глобин образует комплекс с гемом [113]. Бел-

ковая составляющая гемоглобина (глобин) построена из 4-х полипептидных цепей, две из которых альфа (α) и две – бета (β). Они различаются первичной структурой и длиной (141 и 146 аминокислотных остатка, соответственно). Вторичная структура представлена α -спиральными сегментами, соединенных неспиральными участками. Характер укладки полипептидной цепи в α - и β -субъединицах, а также в мономерном связывающем O_2 мышечном белке миоглобине, однотипен. Третичные структуры у цепей сходны. Внутри каждой структуры имеется ниша (карман), в котором расположен гем (рис. 8).

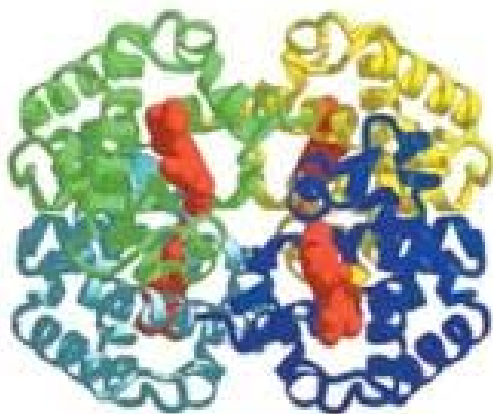


Рис. 8. Строение молекулы гемоглобина

идут: одна на соединение с белком, а другая с различными (другими) лигандами: физиологическим – кислород либо чужеродными – оксид углерода (II), цианид и др. Одну-две дополнительные ионные связи с белком образуют остатки пропионовой кислоты гема.

Гем представляет соединение протопорфирина IX из 4-х пиррольных колец и Fe^{2+} с координационным числом 6: две ковалентные связи с атомами азота двух пиррольных колец и две координационные связи с атомами азота остальных двух. Оставшиеся две связи

Донором железа служит депонирующий железо в клетках белок ферритин. Гем по принципу отрицательной обратной связи ингибирует аминолевулинатсинтазу и аминолевулинатдегидратазу и является индуктором трансляции α - и β -цепей гемоглобина. Гем также является простетической группой цитохромов, каталазы и пероксидаз.

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

Основная функция гемоглобина состоит в связывании O_2 в легочных капиллярах и транспортировке его к тканям. В каждом эритроците содержится около 400 млн. молекул гемоглобина. За сутки у человека происходит распад около 9,0 г этого белка, главным образом, при старении и разрушении эритроцитов. Последние разрушаются в кровяном русле и селезенке с полным оборотом в 120 дней.

В функционирующем комплексе Fe^{2+} не окисляется в Fe^{3+} , так как молекула O_2 в гемовом кармане находится в гидрофобном окружении. Каждый из 4-х атомов железа гемоглобина может присоединять и отдавать по одному атому кислорода (1,0 г Hb присоединяет 1,34 мл O_2). Физиологически важным является кооперативный характер связывания O_2 Hb, обеспечивающий увеличение значений констант, характеризующих последовательные этапы взаимодействия. Кривая кооперативного связывания называется сигмоидной, поскольку ее график имеет S-образную форму (рис. 9).

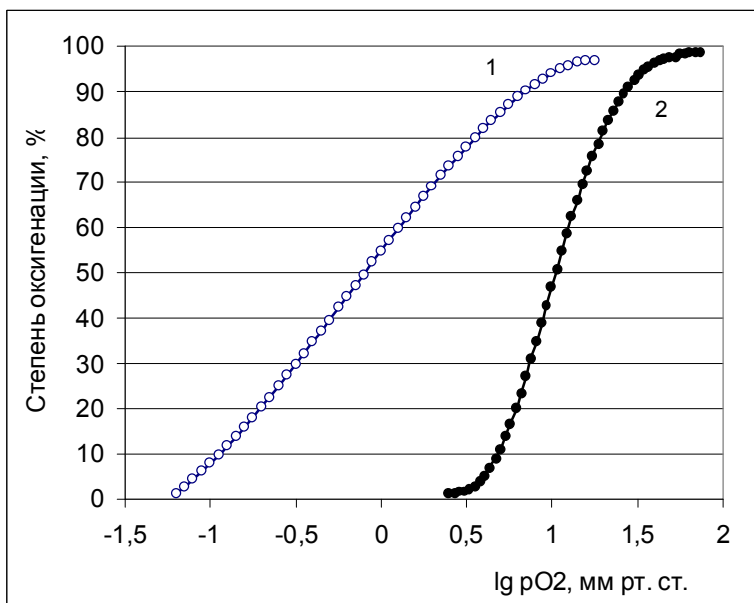


Рис. 9. Различия в насыщении кислородом миоглобина (1) и гемоглобина (2) как пример наличия (2) и отсутствия (1) кооперативного эффекта

В капиллярах легких при парциальном давлении $O_2 H''$ 100 мм Hg, гемоглобин почти полностью насыщен кислородом. При прохождении же эритроцитами капилляров тканей, где парциальное давление $O_2 H''$ 5 мм Hg, за счет кооперативности достигается более полная отдача кислорода, чем если бы каждая субъединица разгружалась самостоятельно.

Сродство восстановленного гемоглобина (дезоксигемоглобин) к кислороду слабое. Однако, по мере оксигенации субъединиц сродство к O_2 остальных возрастает примерно в 500 раз вследствие проявления кооперативного эффекта, что и отражает кривая насыщения на рис. 9. Дезоксигемоглобин находится в А(Т)-конформации, а оксигемоглобин – в В(R)-конформации. Раздельные субъединицы Hb и миоглобин независимо от состояния оксигенации находятся в В-конформации. Интересным и важным для токсикокинетики и токсикодинамики кровяных ядов (оксид углерода II, нитриты) является тот факт, что при связывании с гемоглобином они также проявляют кооперативность. Последнее необходимо учитывать при оценке степени опасности развития отравления во времени даже при постоянных концентрациях токсиканта в воздухе.

Следует подчеркнуть, что процесс переноса кислорода гемоглобином из легких во все органы и ткани обеспечивается сложной системой морфофункциональных связей и поливалентной многоуровневой системой регуляции [114]. Кислород, доставляемый в мышцы гемоглобином эритроцитов, удерживается в них миоглобином [115]. Как гемоглобин, так и миоглобин представляют собой комплексы железа, в которых группа ферропротопорфирина (гема) содержит Fe (II). Белок мышечной ткани миоглобин содержит 3-5 % общего пула Fe в организме. Как было показано выше, различия между гемоглобином и миоглобином определяются числом субъединиц (4 и 1), конформацией и возможностью конформационных переходов, обеспечивающих кооперативность (присущи только гемоглобину). При этом в обоих случаях каждая субъединица специфическим образом уложена вокруг плоского железосодержащего кольца гема. Эта конфигурация одинакова как для α - и β -субъединиц, так и для

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

гемоглобина и миоглобина в целом, что подчинено оптимальному выполнению главной физиологической функции – обеспечению соответствующих тканей кислородом.

Связанное с гемоглобином железо — это подвижная и легко обменивающаяся фракция. Помимо этого в организме существует пул медленно обменивающегося негемового железа, которое находится в ретикулярных клетках печени, селезенки и костном мозгу, а также в мышцах. Кроме того, в депонированной форме находится около 25 % железа, которое мобилизуется при повышении потребности вследствие интенсификации энергетического обмена либо появлении дефицита поступления Fe в организм из экзогенных источников. При этом различия во временных характеристиках обмена определяются взаимосвязью между активностью выполняемых конкретными металлопротеинами физиологических функций, меняющейся в широком диапазоне величины потребности в микроэлементе для их осуществления и интенсивностью работы соответствующих транспортных систем [116]. Последние включают подсистемы накопителей и хранителей металла, высокоактивных транспортеров, сигнальных, регуляторных и вспомогательных макромолекул. Они представляют взаимодействующие между собой сложные металло-лигандные комплексы, осуществляющие поддержание необходимого уровня микроэлемента в клетках и тканях.

И хотя многие аспекты их синтеза, механизмы функционирования и взаимодействия остаются недостаточно изученными, в основе работы системы металлтранспорта, безусловно, существуют общие закономерности, которые станут более понятными при рассмотрении и сопоставлении ее основных представителей, а также выполняемых ими физиологических функций.

Трансферрины (сидерофилины) – группа белков, характеризующихся способностью специфично, прочно и обратимо связывать ионы негемового железа Fe(III) и ионы других переходных металлов [104]. Функция сывороточного трансферрина (ТФ) состоит в транспортировке иона железа

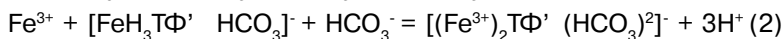
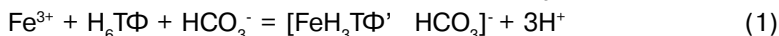
в кровь и направлении его к ретикулоцитам, которым он необходим для биосинтеза гемоглобина. Имеется не менее 18 генетических разновидностей ТФ человека.

ТФ — железосодержащий белок, который в зависимости от первичной структуры может быть двух видов: 1 — сывороточный и кональбумин из яичного белка, и 2 — лактоферрина молока, слез, желудочного сока, бронхиального и тканевого секрета. Все они обладают одной главной способностью — связывать металл — и объединяются в сидерофилины. После выделения и очистки некоторые препараты ТФ могут быть физиологически неактивны, хотя и способны связывать железо. Молекулярная масса 75-80 КДа [104]. Молекула ТФ состоит из одной полипептидной цепи



Рис. 10. Реконструктивная модель строения молекулы трансферрина

Каждая молекула ТФ связывает 2 иона железа. Причем, связывание одного иона железа (III) при pH 7,5-9,5 сопровождается выделением 3 протонов (меди (II) – двух). В связывании участвует бикарбонат-анион CO_3^{2-} :



Ионы Fe^{3+} в первую фазу связываются очень быстро (почти мгновенно), а потом наступает медленная фаза. Таков двухступенчатый механизм связывания железа ТФ.

В состав металлсвязывающего центра ТФ, как видно на рис. 10, входят азотсодержащие фрагменты имидазольного кольца His 252 и гуанидиновой группировки Arg 121, а также кислородсодержащие остатки Tyr 93 и Tyr 191 и карбоксиль-

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

ная группа Asp 61. В показанном примере связи железа с атомами азота аргинина и атомом кислорода одного из тирозильных остатков отсутствуют, так как эти места связывания используются для второго атома железа (при соответствующих конформационных изменениях в связывающем центре). Анионы HCO_3^- в модели не показаны. У ТФ существует два эквивалентных невзаимодействующих центра связывания. При относительно фиксированных pH и $p\text{CO}_2$, которые преобладают в кровеносной системе человека, кажущееся значение K_1 (константа связывания) составляет примерно 10^{24} M^{-1} , т.е. связывание является достаточно прочным.

Помимо железа и меди, ТФ способен связываться с такими многовалентными катионами, как Zn, Mn, Co, Cr, Cd, Ni, Ga. При этом они образуют комплексы такого же стехиометрического состава, как железо. Вероятно, лиганды белка образуют достаточно гибкий связывающий сайт (связывающую нишу), что объясняет легкую приспособляемость этого центра к иону металла. Химическая модификация до 50% свободных аминок групп не сказывается на способности ТФ связывать железо. Процесс сопровождается участием в комплексе бикарбонат-иона, который в комплексообразовании металла с ТФ играет главную роль. На каждый ион металла связывается также один бикарбонатный ион. После связывания удалить бикарбонат из комплекса практически невозможно. Полагают, что он связан не только с ионом металла, но и присоединяется к определенным группам в белке. Fe(II) связывается с ТФ очень слабо. В осуществлении белком металлсвязывающей функции важная роль принадлежит остаткам тирозина, что подтверждено спектрофотометрическими исследованиями.

В физиологических условиях (pH и парциальное давление O_2) для осуществления кислородтранспортной функции предпочтительной является степень окисления железа Fe^{3+} . Поскольку произведение растворимости гидроксида железа (III) равно 10^{-36} , то равновесная концентрация ионов Fe^{3+} в плазме при физиологическом pH крови не может превышать 10^{-14} M . Это выдвигает необходимость существования переносчика для ионов железа. Данному условию удов-

летворяет ТФ, который одновременно выполняет и другую важную физиологическую функцию – поиск и узнавание ретикулоцитов, синтезирующих гемоглобин. Такие клетки могут акцептировать железо при взаимодействии с этим белком. Связанный с железом ТФ обладает большим сродством к рецепторам ретикулоцитов, чем апотрансферрин. Это обеспечивает диссоциацию комплекса ретикулоцит – трансферрин. При этом среднее время пребывания белка на поверхности клетки составляет 5-10 мин. Взаимодействие ТФ – ретикулоцит осуществляется в 4 этапа:

- адсорбция молекулы ТФ на наружной мембране клетки и взаимодействие с рецепторами;
- образование прочной связи с рецепторами (проникновение молекулы ТФ в клетку);
- перенос железа из комплекса от белка в клетку;
- отсоединение белка от мембраны ретикулоцита.

Подсчитано [117], что на поверхности ретикулоцита имеется около 50000 рецепторов, при соединении с ними комплекса около 2% поверхности клетки занято ТФ. Всего же с ретикулоцитом может быть связано порядка 500000 молекул белка. Скорость поглощения железа ретикулоцитом не зависит от степени насыщения им ТФ. Механизм переноса железа в синтезирующий гемоглобин аппарат ретикулоцитов неизвестен. Проникновение ТФ в ретикулоцит происходит с понижением локального значения рН внутри клетки, достаточного для того, чтобы железо отделилось от белка. Система ТФ - ретикулоцит уникальна для изучения взаимодействия металла с транспортным белком и белка с клеткой. (Это напоминает процесс освобождения ТМ из комплекса с МТН в лизосомах эпителия проксимальных канальцев, где рН бывает снижено до 5,0).

ТФ выполняет определенную регулируемую функцию при изменениях концентрации железа. Однако, в условиях хронической перегрузки организма железом, когда ТФ полностью им насыщен, или при врожденном дефиците белка, железо откладывается в тканях и может развиваться ферротоксикоз. В этом плане большое значение имеет накопление

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

железа в организме, которое извлекается из пищи в ничтожно малых количествах и настолько же мало выводится из организма. Эту функцию выполняет водорастворимый железосодержащий белок ферритин (ФР).

Ферритин обнаружен в организме позвоночных и беспозвоночных животных, в растениях и грибах [118]. Во всех многоклеточных животных и растениях он выполняет одну и ту же роль – накопителя железа в организме.

Физиологическая функция ФР состоит в сохранении железа в легко доступной форме Fe (III). Этот вид железа при нейтральных значениях pH малорастворим и токсичен даже в очень низких концентрациях. Поэтому ФР не только накапливает, но и обеспечивает безопасность организма, доступность железа и регуляцию процессов поглощения: если обычно ФР накапливается преимущественно в печени, селезенке и костном мозге, то при введении больших доз железа, его находят также в слизистой оболочке кишечника.

ФР устойчив к нагреванию, поэтому его выделяют из водного экстракта ткани после прогрева на водяной бане при 80 °С, удаления денатурированных белков и осаждения сульфатом аммония. Для очистки применяют 5% раствор CdSO_4 с последующим диализом при pH 4,6.

Максимально ФР содержит 4500 атомов Fe на молекулу белка. Показано, что молекула ФР имеет молекулярную массу 450-480 кДа и состоит из 24 субъединиц по 23 кДа каждая (рис. 11). Субъединица состоит из 5 α -цепей, из которых четыре образуют антипараллельные спирали вдоль оси

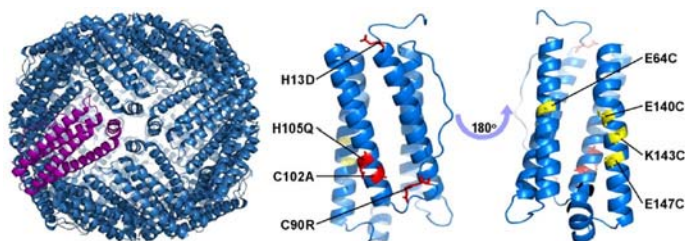


Рис. 11. Реконструкция субъединицы ферритина и их объединение в ферритин

субъединицы, а пятая цепь короткая и почти радиально пересекает субъединицу.

Это кольцо между цепями В и С расположено на внешней поверхности молекулы и почти не имеет вторичной структуры (спираль не скручена, а вытянута в линию). Димеры таких субъединиц являются основными блоками, из которых строится молекула апоферритина. При этом каждая субъединица состоит из остатков 18 аминокислот и контактирует с пятью соседними.

ФР представляет глобулу, внутренний диаметр которой – 73 Е, а внешний – 122 Е. Ее грани имеют форму икосаэдра, 20 граней которого занимают субъединицы белка, охватывающие железосодержащее ядро. Ферритины из разных источников (вид животного, ткани) имеют разный аминокислотный состав и электрофоретическую подвижность. Нативный белок более устойчив к действию протеаз, чем апоферритин, что, вероятно, обусловлено влиянием железа, которое ингибирует протеолиз, препятствуя разворачиванию белковой молекулы [119]. Однако электрофоретические подвижности ФР и апоферритина одинаковы.

Именно железо обуславливает спектр поглощения ФР при 280 нм в УФ-области, при этом доля белка в поглощении — лишь около 7 % (при 310 нм – 1 %). Железо ФР находится в мицеллах, образованных комплексом гидратированного оксида железа с фосфат-ионом $[(\text{FeO}(\text{OH}))_8] (\text{FeO}:\text{OPO}_3\text{H}_2)$. Мицеллы железа могут быть отделены от белка обработкой растворами сильных щелочей, уксусной кислоты, 5% гипохлоритом натрия, перекисью водорода или додецилсульфатом натрия. Диаметр мицеллы 55-60 Е. Она образует центральное ядро внутри белковой оболочки [120].

Биосинтез ФР в клетках слизистых оболочек индуцируется наличием железа в пище и этот процесс начинается синтезом *de novo* апоферритина. Не содержащие Fe молекулы накапливают его примерно за 72 ч [121]. В качестве исходного субстрата используется Fe^{2+} , а получают продукт типа гидроксида железа (III). АТФ и аскорбиновая кислота

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

регулируют перенос Fe из ТФ на ФР. При этом АТФ выступает не как источник метаболической энергии, а как хелатирующий агент. Аскорбиновая кислота выступает как восстанавливающий агент, израсходование которого прекращает процесс переноса [122]. В процессе участвует также атмосферный кислород. Хелатирующий агент ответственен за выход Fe из ТФ, тогда как вхождение его в ФР происходит по градиенту концентраций (чем больше Fe в ФР, тем он меньше поглощает железа). Повышение pH и концентрации Fe может вызывать увеличение числа ядер и ускорение осаждения гидрата окиси железа. При нейтральных значениях pH гидроксильные группы обладают большим сродством к Fe^{3+} чем к Fe^{2+} . Поэтому, если железо вошло в молекулу апоферритина как хелатное соединение Fe (II), то хелатирующий агент замещается путём гидролиза и окисления до Fe^{3+} [123].

Освобождение Fe из ФР может происходить из интактных молекул, из ядер ФР после разрушения белковой оболочки или иным способом с одновременным восстановлением Fe (III) до более растворимого Fe(II), либо посредством образования хелатированных комплексов Fe^{3+} [124]. Пока эти позиции остаются неопределёнными. Способность восстанавливающих агентов, цистеина, аскорбиновой кислоты, глутатиона выделять железо из ФР при pH 7,4 свидетельствует в пользу восстановительного механизма [125].

Выделение железа из ферритина может происходить в условиях низкого напряжения O_2 в крови, когда содержащееся в ферритине железо начинает выступать как акцептор электронов по отношению к восстановительной ксантинооксидазе [126].

Все эти пути и возможности переноса железа относятся к традиционным с точки зрения использования стимулирующих агентов (хелатообразование, восстанавливающие вещества). Но такие способы позволяют осуществить, например, высвобождение железа из ФР лишь в течение нескольких недель [127]. Необходимы дальнейшие исследования для раскрытия механизмов обеспечения металлами окислительно-восстановительного баланса в организме. В частности,

это касается возможностей взаимодействия металлов переменной валентности, в том числе в металлопротеиновых комплексах.

Среди последних достижений в этой области следует выделить, например, обнаружение ферритина в митохондриях [128]. Первоначально найденный в яичках и сидеробластах, он был позже обнаружен в других органах, включая сердце, головной и спинной мозг, почки, поджелудочную железу, исключая печень и спленоциты селезенки, которые ответственны за хранение биодоступного железа. Исследования показали, что митохондриальный ФТ не включается в процессы накопления и хранения железа, а выполняет роль в защите митохондрий от железозависимого оксидативного стресса.

Характерным металлопротеином, участвующим в процессе окисления Fe (II) в Fe (III), является церулоплазмин (ЦП), с функционированием которого в организме человека и животных связано появление термина «ферроксидазная активность». На характеристике этого металлопротеина, который, наряду с функциями накопления, хранения и снабжения клеток железом, обладает также ферментативной активностью, следует остановиться подробнее.

Церулоплазмин — медьсодержащий гликопротеин. Он представляет собой белок молекулярной массой 160 кДа с электролитической подвижностью, соответствующей фракции $\alpha_1 - \alpha_2$ - глобулинов. На одну молекулу приходится 6-7 атомов меди. До внедрения меди в белок он называется *алоцерулоплазмин*, после — *холоцерулоплазмин*. [129]. Его основной функцией в тканях является участие в регуляции содержания меди.

Медь – эссенциальный переходный металл, микроэлемент, который играет важную роль в осуществлении широкого круга физиологических функций, включая регуляцию процессов транскрипции, генерирование энергии, ангиогенез, синтез нейропептидов, защиту от оксидативного стресса, пигментацию, формирование соединительной ткани, поступление и распределение в клетке железа [130]. Ионы меди

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

обладают слабой диффузионной способностью, легко усваиваются в желудочно-кишечном тракте, что может способствовать прогрессивному ее накоплению в организме. При избытке в организме она становится токсичной [131, 132]. Поэтому концентрация Cu в тканях человека поддерживается на постоянном уровне. Для этого необходим механизм, стимулирующий выведение либо препятствующий накоплению данного металла в организме, который и реализуется при участии церулоплазмينا.

Использование и биологическая значимость меди зависит от ее способности создавать цикл между окисленной Cu (II) и восстановленной Cu (I) при ее поступлении в клетку. Однако эти же окислительно-восстановительные свойства лежат в основе генерирования свободных радикалов и токсического действия Cu [133].

Перемещение Cu в клетки осуществляется с участием гомеостатических белков, одновременно предотвращающих токсические эффекты металла. Металлошаперон меди HAH1 (у человека - Atx1) связывает Cu(I) по типу CXXC связи в виде петли-1/ α 1 структуры, похожей на $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -ферредоксин. В сложенном виде каждый из 6 металлосвязывающих доменов (MBDs) двух АТФ-аз Р-типа направляют Cu для соединения с HAH1, который сопровождает ее в процессе транспорта из кишечника для недопущения проявления ею токсических свойств. Изменение pH в клетке и ее компартментах обеспечивает создание термодинамического градиента, который изменяет прочность связывания Cu (I) с HAH1 и обеспечивает его переход к белку Менкеса - MNK1 [134].

Мембранный транспортный белок Ctr1 является высокоактивной медной пермеазой (семейство мембранных транспортных белков, осуществляющих пассивный транспорт специфических молекул внутрь клетки и из цитоплазмы). Ctr1 определяется в организмах практически всех биологических уровней от дрожжевых клеток до человека и обеспечивает поступление Cu (I) из экстрацеллюлярной среды в клетку. При этом на мембране существует механизм, осуществляющий восстановление Cu (II) в Cu (I) за счет действия на поверхно-

сти клетки металлоредуктазы Fre1, подобной человеческой *gp91phox* субъединицы NADPH-оксидазного комплекса, который утилизирует гем и флавины за счет передачи электрона при переходе от одной формы меди к другой. В это же время белок Ctr2, структурно подобный Ctr1, локализован в мембране клеточных вакуолей дрожжевых клеток (*Saccharomyces cerevisiae*). Последние сопоставимы с лизосомами клеток млекопитающих и выполняют подобные физиологические функции. Ctr2 способствует накоплению Cu в этих компартментах и совместно с металлоредуктазой Fre1 импортирует Cu (I) в клетку, тогда как тот же транспортер Ctr2 и металлоредуктаза Fre 6 являются медиаторами экспорта меди из клетки.

В результате оба процесса — вхождение Cu (I) в интрацеллюлярное пространство и его экспорт из клетки — оказываются тесно взаимосвязанными [135].

Интересно отметить и тот факт, что Ctr2 также участвует в мобилизации меди из полости вакуоли в ответ на возрастание потребности в металле при ее дефиците в экстрацеллюлярной среде. И в то же время уровень мРНК Ctr2 повышается в ответ на недостаток Fe быстрее и активнее, чем в ответ на дефицит Cu. Была высказана гипотеза, что недостаток внутриклеточного Fe приводит к активации *de novo* синтеза Fet3 и его связывания с Cu (процесс регулируется фактором Aft1/2, сопряженным с металлоредуктазой, который одновременно индуцирует синтез транспортера меди Ctr2 и транспортирующей медь АТФ-азы CCC2, а также экспрессирует синтез CTR2 мРНК [136]. Если же недостаток экстрацеллюлярной меди сохраняется, возрастает и дефицит внутриклеточного Fe.

Таким образом, сложный комплекс белков-транспортеров, регуляторов и шаперонов участвует в поддержании интрацеллюлярного уровня эссенциальных металлов на оптимальном уровне, обеспечивая выполнение ими весьма разнообразных физиологических функций.

Гомеостаз меди тесно связан с МТН, шаперонами меди и АТФ-азами Р-типа. Только за последнее десятилетие стали

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

детально разрабатываются сложные механизмы, лежащие в основе распределения и функционирования Cu в клетках. Медь накапливается в клетках с помощью МТН и распределяется при участии специальных шаперонов в клетках определенных типов, где она проявляет свои окислительно-восстановительные свойства [137]. Транспорт Cu во вновь синтезируемые купроэнзимы и удаление остатков Cu осуществляются за счет действия экспрессируемых в тканях АТР7А и АТР7В. В печени млекопитающих находится основной механизм захвата, распределения и экскреции Cu. Мутации АТФ-аз Р-типа приводят к нарушению их функций и развитию болезни Вильсона-Коновалова (АТР7В) либо болезни Менкеса (АТР7А).

Стойкое снижение содержания ЦП в тканях является одним из ранних признаков заболевания, известного как болезнь Вильсона-Коновалова, сопровождающегося накоплением меди в организме [139]. Сочетанный эффект накопления меди и снижения содержания ЦП в организме лежит в основе перехода Cu из разряда эссенциальных в токсичные элементы.

Болезнь Вильсона-Коновалова — сравнительно редкое аутосомальное рецессивное заболевание, вызванное генетически обусловленным нарушением метаболизма меди. Печень теряет способность обеспечивать транспорт и запасать

Таблица 9

Медьзависимые белки. Биологические функции (из [137])

Название	Биологическая функция	Нарушение при недостатке меди
Супероксид-дисмутаза	Связывание оксидантов	Свободно радикальное повреждение клеточных органелл и мембран
Цитохром С-оксидаза	Перенос электронов в окислительной цепи митохондрий	Симптомы дефицита АТФ; миопатия; атаксия; судороги
Лизилоксидаза	Химическая модификация коллагена и эластина	Нарушение функционирования соединительной ткани: васкулит, эритема, старение кожи
Дофамин-р-гидроксилаза	Биосинтез катехоламинов	Нарушение функционирования гипоталамо-гипофизарной системы: гипотермия, гипотензия, дегидратация, сонливость
Тирозиназа	Продукция меланина	Витилиго; снижение защитных свойств кожи под воздействием ультрафиолета; рак кожи
Пептидил глицерин-монооксигеназа	Активация ряда пептидных гормонов	Гормональные нарушения

из пищи нормально абсорбируемую медь, что приводит к ее накоплению в печени, базальных ганглиях мозга, глазном яблоке и других органах и тканях, Первые признаки заболевания проявляются у 40 % больных начальными неврологическими симптомами, еще примерно у 40 % — нарушениями функций печени и у 10-25 % — изменениями и расстройствами психики [140].

Нарушается нормальная последовательность транспорта меди в цепи АТР7В – ЦП– желчь. При этом, как считают авторы, лимитирующим элементом системы является нарушение выделения меди с желчью. В норме АТР7В локализована в эндосомах клеток печени, откуда внутриклеточный Си-транспортирующий белок Неймана-Пика типа С (Niemann-Pick type C, NPC1) доставляет медь в секреторный домен аппарата Гольджи, где он связывается с апоЦП и образует холо-ЦП [141]. NPC1 регулирует внутриклеточный транспорт везикулярных образований в цитоплазме клеток, в частности, эндосом. Индукция фенотипа NPC1 способствует активации процесса транспорта меди АТР7В с образованием холо-ЦП. Этот металло-белковый комплекс обеспечивает вместе с МТН биосинтетические, энергетические, нейротрансмиттерные функции биодоступной медью. Поэтому в патогенезе целого ряда заболеваний изменениям в системе обеспечения Си принадлежит важная роль.

Среди основных видов патологических нарушений, обусловленных избытком меди в организме человека, указывают также на психические расстройства, тремор рук, признаки гепатита и цирроза печени, нарушение функций почек (синдром Фанкони), гемолитическая анемия.

Всего 30 лет тому назад И.Г. Шейнберг и А.Дж. Морелл [142] отстаивали точку зрения, что «явления дефицита меди в организме человека неизвестны, так как она поступает в достаточных количествах практически при любом рационе питания». Поэтому «физиологические последствия дефицита меди проявляются исключительно у животных» (с. 361). Так, овцы, выпасаемые на землях, бедных этим микроэлементом, дают потомство с рядом морфологических дефек-

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

тов в ЦНС (появление демиелинизированных нейронов). В условиях дефицита меди может нарушаться активность таких медьсодержащих ферментов, как цитохромоксидаза (ЦХО), тирозиназа, замедляется рост костной и соединительной ткани, притупляется проявление нормальных вкусовых ощущений.

За последние годы накопилось достаточно убедительной информации о возникновении у людей гипомикроэлементозов по меди. В частности, в сводке, представленной в руководстве под ред. Н.И. Калетиной [143], приводится перечень нарушений функционального состояния организма человека при дефиците меди: «анемия, задержка психомоторного развития у детей, дефект кератина и нарушение пигментации волос,... психические расстройства, поражение костной ткани, наследственные заболевания (болезнь Вильсона-Коновалова, синдром Менкеса и др.)» (с. 810).

Болезнь Менкеса — нарушение клеточного транспорта меди, при котором наблюдаются замедление роста, патологии нервной системы, а также характерное закручивание волос, за что это состояние также называют «болезнью курчавых волос». Комплекс симптомов вызывается мутациями в гене АТР7А, кодирующем АТФ-азу, которая участвует в поглощении меди из пищи и передаче ионов этого металла в другие клетки [144, 145, 146].

Кроме того, было показано, что при недостатке меди в организме заметно ухудшается захват железа трансферрином из его депо, что является необходимой стадией включения железа в гемоглобин [147].

Поскольку метаболизм меди в организме и его нарушение находятся в сложной взаимосвязи с другими эссенциальными металлами, Trocello J.M. et al. справедливо указывают на необходимость проведения комплексных исследований для раннего обнаружения и диагностики соответствующих металлопатий [148]. В качестве ведущих показателей указанные авторы выделяют:

- исследование содержания меди в сыворотке крови и суточной моче для установления недостатка поступле-

ния меди с пищей, генетических нарушений, приводящих к болезни Менкеса;

- определение церулоплазмينا в сыворотке крови совместно с предыдущими показателями для установления перегрузки организма медью генетической и алиментарной природы (болезнь Вильсона);
- исследование активности ферроксидазы совместно с предыдущими показателями и определением содержания железа в крови и моче. Последнее является эффективным способом выявления сочетанных нарушений гомеостаза меди и железа в организме.

Нам представляется, что указанную батарею тестов следует дополнить определением содержания в биосубстратах цинка и металлотиионеина. Данная позиция корреспондируется с положением, отстаиваемым J.R.Prohaska о ведущей роли транспортеров меди не только в ее гомеостазе, но и организации системы защиты клеток от оксидативного стресса, блокировании апоптоза и восстановлении нарушенной биллиарной функции печени, в которых принимают активное участие металлотиионин, церулоплазмин и медьсодержащие шапероны [149].

Разнообразие симптомов, синдромов первичных и вторичных функциональных нарушений, связанных с избытком либо недостатком не только меди, но и железа в организме, делает проблему изучения механизмов действия церулоплазмина и его биологической роли в метаболизме различных видов клеток, органов и тканей человека и животных разных видов одной из актуальных в эволюционном, физиологическом, биохимическом и генетическом плане.

Как показывают накопленные в литературе данные [150], дефицит церулоплазмина в крови лежит в основе нейродегенеративных процессов в головном мозге, непосредственно обусловленным накоплением в мозговой ткани железа. У пациентов с мутациями в медь-оксидазе прогрессивно нарастают изменения в ЦНС. Именно ЦП обеспечивает экспрессию в клеточной мембране ферропортина – белка, регулирующего процесс выведения Fe из клеток. При этом

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

комплекс ЦП с гликозилфосфатидилинозитолом является доминирующим гликопротеином в мозговых структурах.

Функции ЦП как феррооксидазы связаны с регуляцией окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} и последующим связыванием железа с трансферрином. При этом ЦП выступает как один из белков семейства медьоксидаз, в которые входит, в частности, и гепестин (hephaestin), осуществляющий регуляцию гомеостаза микроэлементов в мозговой ткани, в том числе и прежде всего железа [151]. И хотя патогенез последующей нейродегенерации остается недостаточно изученным, в опытах на мышях с ацерулоплазмией четко продемонстрировано наличие поражений мозга дегенеративного характера [150]. Вероятно, имеет место недостаток свободного железа в нейронах и избыток в астроцитах и микроглии. При этом происходит также связанный с дефицитом ЦП выход железа из макрофагов, который и приводит к окислительным повреждениям нейронов.

Приведенный пример важен в плане необходимости изучения взаимодействия транспортных белков, мультимодальности осуществляемых ими функций, которые нередко выходят за пределы достаточно суженного представления о выполнении ими чисто «транспортной» или «запасающей» роли. Проявляемые ЦП ферментативные свойства свидетельствуют о его активном участии в наиболее напряженных звеньях клеточного метаболизма, ответственных за окислительно-восстановительный баланс в тканях, наиболее чувствительных к проявлениям окислительного стресса, в частности, в головном мозге. Белок выполняет также сигнальные функции, обеспечивая взаимодействие меди и железа в клеточном метаболизме нервной ткани. Снижение уровня ЦП запускает сложный патофизиологический механизм с участием недавно открытого белка ферропортина, а также гепсидина, трансферрина и ферритина, приводящий к выходу железа из клеток, нарушению соотношения Fe^{2+} и Fe^{3+} и развитию окислительного стресса [152]. Такого рода дисбаланс в различных тканях организма может быть обусловлен также действием токсичных металлов, например, кадмия, цис-платины и других металлов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в настоящем разделе данные показывают, что металлы выполняют в биосистемах множественные функции, как правило, находясь в составе металлобелковых комплексов (металлопротеинов). В последние годы сделан существенный прорыв в использовании современных методов анализа, позволяющих проводить быстрый структурный анализ большого количества белков, изучение поглощения, накопления, транспорта и хранения микроэлементов (металлов), необходимых для выполнения белками физиологических функций. Это стало возможным в связи с развитием новых направлений в современной биологии, таких как геномика, протеомика, биоинформатика.

Металломика и металлопротеомика – новые, быстро развивающиеся направления (области) в молекулярной биологии и биохимии, занимающиеся изучением роли, поглощения, накопления, транспорта и хранения микроэлементов (металлов), необходимых для выполнения физиологических функций белками. Их методология базируется на идентификации, квантификации и изучении функций металлопротеинов.

Стало возможным проводить быстрый анализ и расшифровку структурных моделей белков и их последовательностей в 95% случаев (при наличии или отсутствии металла) в стехиометрических соотношениях. Например, в исследовании, проведенном W. Shi et al. [153], было выделено практически одновременно около 500 семейств белков, в каждом из которых был охарактеризован не менее чем один представитель. На основе регистрации и квантификации рентген-флуоресцентных сигналов Нью-Йоркским исследовательским консорциумом структурной геномики (the New York Structural Genomix Research Consortium) был проведен анализ 654 белков, из которых более 10 % содержали переходные металлы в стехиометрических соотношениях. Новые методы позволяют таким же образом идентифицировать тысячи белков, что открывает большие возможности для решения задач молекулярной биологии, биохимии, иммунологии, медицинской,

РАЗДЕЛ 2. МЕТАЛЛОПРОТЕИНЫ И ТРАНСПОРТНЫЕ БЕЛКИ

промышленной и экологической токсикологии.

Использование современных методов анализа вместе с раскрытием структуры и последовательностей (нуклеотидного состава) генома позволило создать большую базу данных о первичной структуре белков, в том числе металлопротеинов [154]. Они оказались совпадающими с данными Банка базы данных о белках (the Protein Data Bank), как по содержанию, так и по распределению. Анализ с помощью методов биоинформатики позволили идентифицировать металлопротеины и сопроводить их данными расшифровки, причем места связывания металла способствовали верификации структурной модели белка.

В ряде случаев такие расшифровки проводятся для определения трехмерной структуры металлсодержащих белковых комплексов. Это позволяет выяснять предпочтительные, в том числе еще неизвестные сайты металл-лигандного связывания. В результате таких исследований К. Goyal, S. C. Mande [155] удалось расшифровать более 1000 таких сайтов. Этот подход дает возможность связать структуру комплексов с их вероятными физиологическими, в частности, ферментативными функциями еще недостаточно изученных белков, а также изучить лежащие в их основе механизмы и закономерности. Многие из них могут быть раскрыты при детальном изучении таких важных в физиологическом и токсикологическом плане, сложных и полифункциональных представителей металлопротеинов, какими являются металлотиионы.

К настоящему времени накоплен огромный объем информации, касающейся различных аспектов биохимии, молекулярной биологии, протеомики, геномики и металломики металлопротеинов и транспортных белков. Их изучение благодаря прорыву последних двух десятилетий выросло в мощное направление современной биологии и медицины, в котором металлы и их транспорт играют ключевую роль. Открыты десятки интегральных и специализированных белков, осуществляющих обратимое связывание и транспорт металлов в сосудистом русле, экстра- и интрацеллюлярном про-

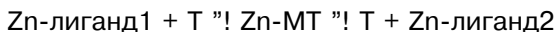
странстве, с преодолением клеточных мембран с помощью разнообразных механизмов, физиологическая сущность которых во многих случаях остается недостаточно изученной. В этом плане вызывает удивление, что есть относительно давно обнаруженные металлотранспортные белки, интерес к которым не ослабевает в течение многих десятилетий. Это может объясняться их необычными, полимодальными, а иногда и исключительными свойствами, наличие которых раскрывается по мере проведения все новых исследований. К таким удивительным белкам относится металлотионеин. Обобщению имеющейся информации по этому важному и многогранному представителю транспортных белков посвящены последующие главы данной монографии.

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

Металлотионеин, более 50 лет тому назад обнаруженный и охарактеризованный В.Л. Vallee с сотрудниками (1957) транспортер Cd и Zn [156], оказался представителем уникального семейства многофункциональных белков, которые играют центральную роль в обмене и детоксикации тяжелых металлов и в управлении различными формами стресса. МТН был выделен как белок, связывающий Cd и Zn, и получил свое название в связи с высоким содержанием в нём металлов и серы [157]. Его структура и строение молекулы хорошо изучены [158]: он идентифицирован как биологический хелатор металлов. И все же МТН остается не похожим на другие белки, а его два специфических Zn-тиолатных кластера существенно отличаются от любых неорганических комплексов Zn (II). Для МТН характерна, в качестве показателя его клеточных функций, исключительно сильная способность связывать ионы Zn вследствие необычной координационной связи металла с цистеином (константа устойчивости $Zn_7\text{MTN-2 } K_{Zn} = 3,2 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ при pH 7,4).

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

Металлотионеин синтезируется в виде апо-белка — тионеина (Т), который является мощным акцептором Zn. В процессе связывания металлов Т превращается в МТН. С другой стороны, сульфгидрильные лиганды высоко реактивны и определяют не только связывание цинка с тионеином, но и его освобождение из МТН [159], который становится донором Zn. Белок-белковое взаимодействие обеспечивает передачу Zn от альбуминовых комплексов (меньшая константа устойчивости) тионеину и далее, создавая при этом однонаправленный поток ионов металла в сторону образования комплексов с большей константой устойчивости:



Изучение функциональных свойств металлотионеина активно продолжается. И хотя эти усилия не всегда оказываются продуктивными, по крайней мере, три фундаментальных свойства, определяемые и проявляемые МТН благодаря наличию двух цинксодержащих кластеров, стали общепризнанными. Это – взаимодействие с глутатионом и обеспечение цинком процессов клеточного синтеза Zn-содержащих белков, регуляция экспрессии генов с помощью Zn-зависимого фактора транскрипции, а также контроль (преимущественно ингибирование) роста и развития нейронов в мозгу [157]. К этому необходимо добавить, что участие МТН в выполнении таких базовых функций, как регуляция концентрации в клетке и поддержание гомеостаза важнейших эссенциальных микроэлементов (Zn и Cu), связывание двухвалентных, в том числе токсичных (Cd и Hg) тяжелых металлов, являются экспериментально, клинически и эпидемиологически доказанными фактами [160, 161].

3.1. СТРУКТУРА БЕЛКА И ЕГО ИЗОФОРМЫ

Металлотионеины (МТН) представляют суперсемейство малых белков с молекулярной массой около 7 кДа ($N \cdot 7000$ г/моль), которые присутствуют практически в каждом живом организме. Они характеризуются высоким содержанием цистеина (около 30 % по массе) и отсутствием в молекуле ароматических аминокислот; содержат 60-68 ос-

татков аминокислот (в клетках эукариотов 60-62). Все Cys находятся в восстановленной форме и скоординированы с ионами металлов через SH-группы, что можно наблюдать спектроскопически [162]. Особое расположение остатков цистеина позволяет МТН связывать с высокой аффинностью атомы одно- и двухвалентных металлов, а их наличие дает возможность снижать содержание активных форм кислорода и азота в клетках.

Неоднородность изоформ является результатом пост-трансляционной модификации и/или изменения в составе металлов. Наиболее широко экспрессируемыми изоформами являются МТН-1 и МТН-2, которые легко индуцируются при воздействии разных факторов. Причем, на базальном уровне МТН-2, как правило, экспрессируется более значительно, чем МТН-1. Изоформы МТН-3 и МТН-4 представляют собой белки, из которых МТН-3 конститутивно присущ и экспрессируется в основном в мозге, почках и репродуктивных органах, а МТН-4 – в клетках плоскоклеточного эпителия. Изоформы МТН человека регулируются независимо друг от друга и могут быть индуцированы ионами металлов, стрессорными гормонами, цитокинами, активными формами кислорода, лекарствами и некоторыми химическими веществами. У мышей известны только четыре функциональных гена МТН (МТН-1, МТН-2, МТН-3 и МТН-4), причем, МТН-1 и МТН-2 изоформы являются координационно регулируемыми.

В то же время, в отличие от четкой и однотипной гомологии МТН у позвоночных, эти и им подобные белки у беспозвоночных животных и других представителей биоты существенно отличаются не только от таковых у позвоночных, но и между собой [163]. В частности, было показано наличие и осуществлено выделение Cu-содержащего МТН у дрожжей. У представителя этого класса (*Saccharomyces cerevisiae*) белок содержит 12 Cys и 8 атомов Cu в молекуле, а общее содержание меди достигает у этих дрожжей 3 мг Cu/г влажных клеток. У грибов видов *Neurospora crassa* и *Agaricus bisporus* Cu-МТН состоит лишь из 25 аминокислот и содержит 6 атомов Cu в молекуле, которые соединены с 7 Cys в один Cu-тиолатный кластер [164]. Изученные апо-металло-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

тионеины беспозвоночных, также показывают наличие подобных доменов со структурными и композиционными изменениями вследствие различия в количестве и относительном положении Cys остатков.

Как указывалось выше, ачальная фаза образования МТН подразумевает синтез тионеина (апотиионеина) – свободной от металлов белковой матрицы. После металлизации молекулы тионеина, создается металлсодержащий белок, образующий с тионеином динамическую систему, обладающую регуляторными функциями.

Непосредственная перестройка нативной структуры после встраивания металлов свидетельствует о ведущей структурообразующей роли Cys в полипептидной цепи (рис. 12).

Влияние тиолов и присоединяющихся ионов металлов



на пространственную структуру МТН определено расчетным методом и наглядно иллюстрируется методом компьютерной графики.

Рис. 12. Двукластерная структура металлотионеина-2 с указанием фрагментов цистеина, которые участвуют в комплексообразовании с металлами.

Строение МТН было рассчитано также методом математического моделирования.

При этом знание точного определения положения дисульфидных мостиков и конфигурации полипептидной цепи, в тех случаях, когда они были установлена методами ЯМР или/и РСА, позволило построить соответствующие модели, исходя из первичной структуры этих полипептидов [165, 166]. Эти белки связывают атомы металлов исключительно в результате образования связей металл-сера остатков цистеина, что предпола-

ет пространственную сближенность соответствующих остатков цистеина данной полипептидной цепи в ее нативной трехмерной структуре. В исследуемой структуре (металлотиионеина человека) имеется 20 остатков цистеина из общего числа аминокислотных остатков 61. Аминокислотные остатки этого белка образуют две группы, содержащие 9 и 11 остатков цистеина и связывающие три и четыре атома металла (Zn, Cd) соответственно. Часть атомов серы выступает в качестве мостиков между тетраэдрами из атомов серы вокруг каждого из атомов металла.

При построении пространственной структуры апотионеина человека по стереохимическому (генетическому) коду, разработанному Л. Б. Меклером и Р. Г. Идлис, выяснено, что полипептидная цепь действительно формирует два домена. В каждом из этих доменов содержится по одному кластеру, содержащему четыре и пять дисульфидных мостиков соответственно, и по одному пространственно сближенному с ними изолированному остатку цистеина. Границы доменов, конфигурация цепи (положение линейных и нерегулярных ее частей, поворотные участки) совпадают с результатами структурных исследований.

Структурные исследования молекулы МТН методом ЯМР-спектроскопии подтвердили [167], что пространственное строение Zn_7 -МТН и Cd_7 -МТН практически не различается (рис. 13).

Несмотря на то, что аминокислотные последовательности МТН разных видов весьма различны, они имеют сходное пространственное строение. МТН млекопитающих, ракообразных и иглокожих, по данным двумерной

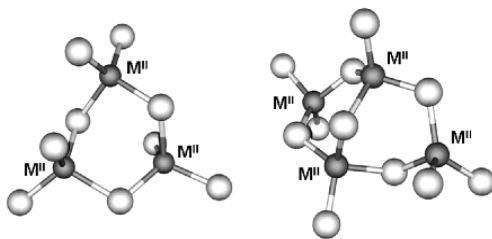


Рис. 13. Компьютерная модель биметаллических тиолатных кластеров в МТН млекопитающих Zn_2Cd_5 МТН-2, полученная с помощью программы РuMOL v0.99 с использованием базы данных «Protein Data Bank (PDB)». (Robbins et al., 1991).

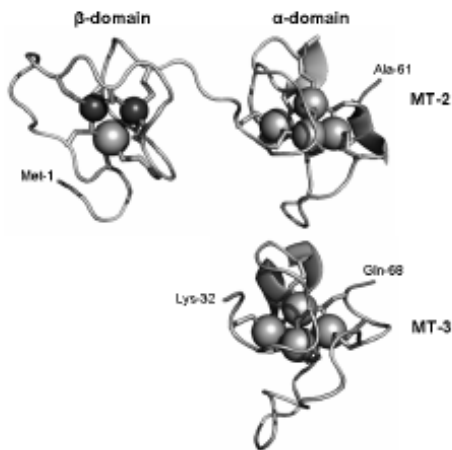


Рис. 14. 3D-кристаллическая структура Zn₂Cd₅MTH-2 крысы (Robbins et al., 1991) (вверху) и рассчитанный с использованием спектров ЯМР α-домен ¹¹³Cd₇MTH-3 человека (внизу) (Wang et al., 2006). Cd²⁺ и Zn²⁺ показаны сферы, связанные с тиолатными группами цистеина. Моделирование проведено с помощью программы PyMOL v0.99 с использованием базы данных «Protein Data Bank (PDB)».

спектроскопии ЯМР и рентгено-кристаллографии, имеют гантелеподобную форму с двумя отдельными белковыми доменами (рис. 14), с основными узлами, создаваемыми несколькими тетраэдрическими Me(II)-Cys единицами. Все Cys включаются в связывание металлов. МТН не содержат почти никаких типичных элементов вторичной структуры.

Первая эмпирическая классификация МТН с делением на три класса (МТН-1, МТН-2, МТН-3) была предложена Fowler и др. [168, 169]. Класс I включает в категорию помимо МТН позвоночных, МТН всех известных ракообразных и моллюсков. Члены класса МТН-1 включают полипептиды с Cys в тех же положениях, что у МТН-1 лошади, в то время как положение Cys в МТН-2 отличаются. Класс МТН-3 - полипептиды, содержащие нетипичные γ-глутамилцистеиниловые единицы.

Так как эта система классификации не позволяет однозначно дифференцировать структуры, все белковые пос-

ледовательности МТН сгруппированы в филогенетические семейства (Класс I и Класс II), связанные соответствующими последовательностями. Подклассификация на подсемейства и подгруппы базируется на филогенетических особенностях аминокислотных и полинуклеотидных последовательностей [169, 170]. На первый взгляд, первичная структура МТН у позвоночных имеет много общего [171, 172]. Тем не менее, даже небольшие различия в последовательностях аминокислот могут приводить к структурным изменениям в МТН, затрагивающим, в частности, способность к связыванию металлов. Это прослежено на примере Cd и Cu-связывающих структурных элементов, которые имеют небольшие различия в положении остатков цистеина [173, 174].

МТН-3, также известный как нейронный ростподавляющий фактор, является металлопротеином, находящимся почти исключительно в нервных клетках. МТН-3 был впервые обнаружен и выделен в 1992 и определяется как специфичный для мозга член семейства МТН. Детальные исследования также показали, что МТН-3 уникален среди членов семейства: в дополнение к металл-связывающей способности он обладает ростподавляющей активностью. Однако недавно было установлено, что значительные количества МТН-3 и мРНК этого белка также имеются в нормальной почке и в модельных культурах клеток эпителия проксимальных канальцев человека (НРТ клетки). Sens D.A. изучал 3 модельных культуры клеток эпителия проксимальных канальцев человека, которые дифференцированно экспрессируют МТН-3 в нормальном состоянии. В первой культуре экспрессия МТН-3 отсутствовала, во второй – была на базальном уровне, а в третьей имела место гиперэкспрессия МТН-3. Эти различия влияли на интенсивность ростовых процессов в проксимальных канальцах, тип и выраженность клеточной смерти при экспонировании Cd^{+2} , что зависело от способности МТН-3 вызвать накопление ранних транскриптов гена реакции роста [175].

Выделенный МТН-3 содержит четыре иона меди (I) и три иона Zn (II), организованные в гомометаллические тиолатные комплексы в двух независимых белковых доменах.

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

Roschitzki В. [176] было описано связывание меди (I) с апотионеином-3. Формирование кластера изучалось электронным поглощением, круговым дихроизмом и люминесцентной спектроскопией при комнатной температуре и 77 К. Пошаговое включение меди (I) в апотионеин-3 человека показало совместное формирование двух Cu(4)S(9) кластеров, которые формируются последовательно в обоих белковых доменах с образованием Cu(4)- и Cu(8)-МТН-3. Дальнейшее присоединение четырех ионов меди (I) вызвало расширение их Cu (I)-ядер с образованием полностью загруженного металлом Cu(12)-МТН-3, содержащего Cu(6)S(9) и Cu(6)S(11) кластеры в β и α - доменах белка, соответственно. Местоположение селективно сформированного кластера Cu(4) в белке было установлено иммунохимически. Продемонстрировано, что Cu(4)S(9) кластер локализован в β -домене N-конца белка, который содержит девять лигандов цистеина. Это еще раз указывает на динамический характер образуемых металло-белковых комплексов.

Еще одним из методов изучения включения металлов и связывания их в кластерах МТН может быть Рамановская спектроскопия [177]. Из данных, представленных на рис. 15, видно, что спектры кругового дихроизма α -домена меньше таковых у цельного МТН, но однотипны с МТН: молярная эллиптичность при 260 нм для α -домена составляла примерно 80 % таковой у цельной молекулы при той же длине волны.

Хирально-оптические свойства молярной эллиптичности у β -домена значительно менее выражены. Тем не менее, молярная эллиптичность составляет лишь 20% от общей величины. Тем не менее, общая величина у цельной молекулы примерно равна сумме таковой у двух изолированных доменов. Что касается электронного спектра Cd-тионеина, то он показывал абсорбционный максимум при 265 нм, с колебаниями до 254 нм, что типично для обмениваемого комплекса. Cd-тионеин показывал внешний эффект Коттона при 260 нм, главным образом, из-за асимметричных взаимодействий тиоловых групп с ионами металлов.

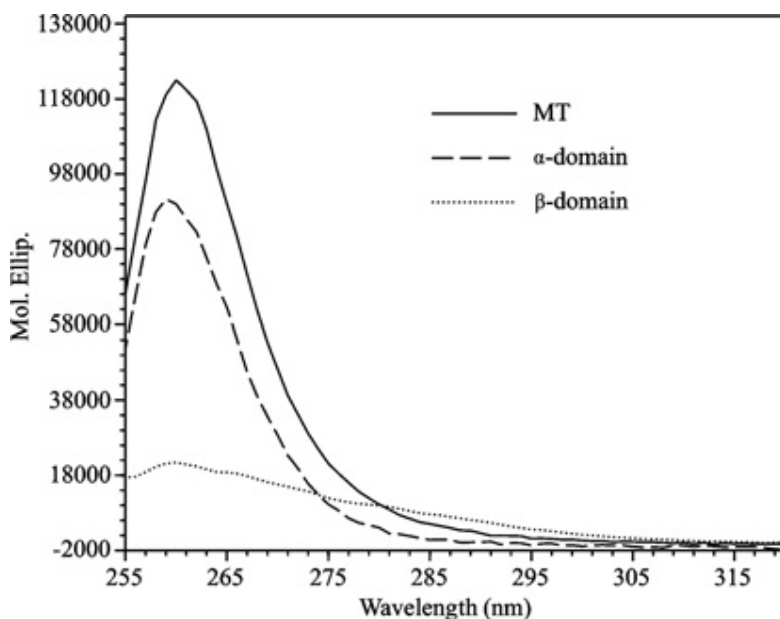


Рис. 15. Cd-MTN (Спектры МТН рыбы и двух выделенных доменов были записаны в УФ области 255-300 нм. Концентрация белка составляла 0,1 мг/мл) (из [177]). Соотношение металл/белок составляло $4,0 \pm 0,2$ и $3,0 \pm 0,1$ эквивалента на моль для Cd и Zn, для α - и β -доменов соответственно.

Исследования показали изменения в хирально-оптических свойствах Cd-тионеина, вызванных температурой, которые были отнесены за счет изменения конформации металл-тиолатных кластеров. Авторы считают, что знание вызванных температурой модификаций и поглощения и CD спектров изолированных доменов МТН может показать неожиданные различия по сравнению с целой молекулы. Кроме того, сравнение спектральных свойств α - и β - доменов МТН могут помочь в понимании вклада этих двух доменов в появление таких различий. Поэтому и Cd_4 - α -домены, и Cd_3 - β -домены МТН рыбы и мыши были проверены на спектральную поглощательную способность при 254 нм в диапазонах температуры между 25 и 90 °С. Результаты на рис. 16 показывают, что устойчивое снижение спектральной поглощательной способности происходит с увеличением температуры;

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

однако, α - домен МТН рыбы, кажется, является больше термочувствительным, чем у мыши (рис. 16А). Поведение изолированного α – домена во время нагревания не отражает поведения цельного МТН. Спектральная поглощающая способность МТН мыши не изменяется до 60 °С, тогда как спектральная поглощающая способность изолированного α -домена начинает уменьшаться приблизительно при 30 °С (см. рис. 16А). Уменьшение спектральной поглощающей способности составляет приблизительно 2 % между 25 и 60 °С, и приблизительно 4 % между 60 и 90 °С. Точно так же изолированный α -домен МТН рыбы более чувствителен к нагреванию, чем цельный МТН рыбы: потеря спектральной поглощающей способности в диапазоне 25-90 °С составляет приблизительно 20 %, тогда как у цельного МТН – 6,6 %. Изолированные β -домены рыбы и мыши ведут себя одинаково в диапазоне температур 25–90 °С (рис. 16В).

УФ спектры были записаны для Cd содержащих доменов рыбы и мыши в интервале температур 20–90 °С. Уровень абсорбции Cd-тиолатного хроматофора при 254 нм зависел от температуры. В конце обменной реакции в изолированных доменах кадмий определяли методом ААС. Молярное отношение кадмия, связанного с α -доменом, равнялось $3,0 \pm 0,1$, тогда как количество металла, связанного с β - доменом, было $2,0 \pm 0,08$. Эти результаты показывают, что в МТН связывание токсичных тяжелых металлов происходит не так, как в изолированных доменах. Последнее отражает наличие стабилизирующего эффекта при взаимодействии доменов МТН в цельной молекуле.

Спектры ЯМР изолированных доменов совершенно не похожи на таковые у исходных МТН, что подчеркивает важную роль взаимодействия между доменами в цельном белке. В частности, индуцируемые температурой изменения хирально-оптических свойств, реактогенность тиолов в Zn-содержащем домене и соотношение обмениваемых Zn^{2+}/Cd^{2+} существенно различаются у каждого из двух доменов и цельного белка. Это исследование является убедительным аргументом в пользу несомненной роли взаимодействия доменов МТН как основного регуляторного механизма, опреде-

ляющего функциональную активность МТН, против иллюзорных поисков структурных филогенетических различий.

Известно, что в процессе окисления происходит димеризация молекул МТН с образованием межмолекулярных -S-S- связей с потерей белком физиологической активности. Это, в частности, вызывает затруднения при количественном определении МТН в моче. В работе [178] изучались подвижные и устойчивые

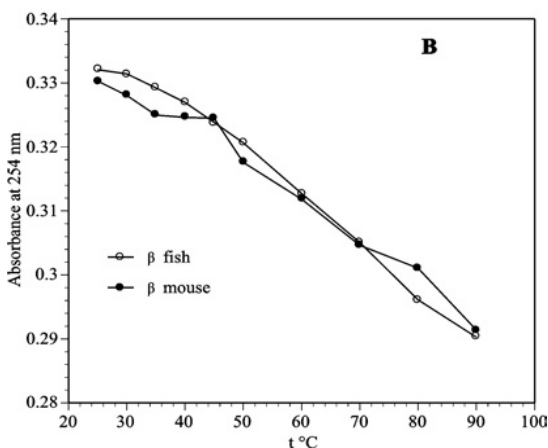
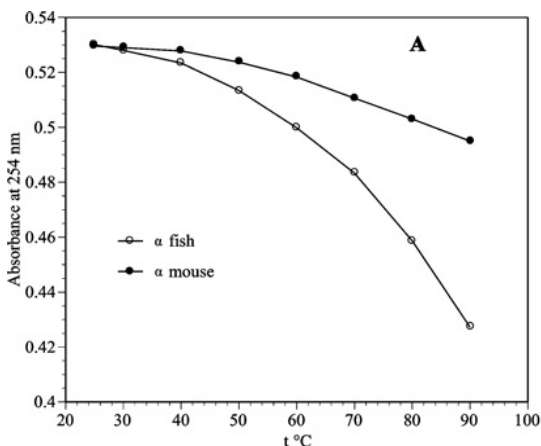


Рис. 16. Влияние температуры на сорбцию тиолат кадмия доменами α- (A) и β- (B) МТН. (из [177]).

димеры металлотхионеина методом наноаэрозольной масс-спектрометрии. Эта работа дополнила данные, полученные ранее при использовании ЯМР, кругового дихроизма и хроматографии. Изучено быстрое перераспределение ионов металлов между мономерным Cd₇- и Zn₇-МТН-2. Эксперимент, в котором две формы мономерного белка отделены диализной мембраной, которая пропускает металлические ионы, но не пропускает белки, подтверждает, что переходный димер формируется при перерасп-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

ределении металлических ионов. С другой стороны, хроматография ресуспендированного Zn_7 - или Cd_7 -металлотионеина показала присутствие мономерной и двумерной разновидности. Показано, что эти димеры не превращаются в мономеры и являются ковалентно связанными.

Анализ белка из почки лошади показал наличие в МТН кадмия – 5,9 %, цинка – 2,2 %, железа – 0,2 % и меди – 0,1 %, что соответствует 4,0 г-атомам кадмия, 2,6 г-атомам цинка, 0,3 г-атомов железа и 0,1 г-атомов меди, исходя из 7 ионов металла на молекулу белка [157]. В тканях млекопитающих белок содержит главным образом цинк, за исключением печени новорожденных и условий перегрузки организма медью, когда в гепатоцитах определяется значительное количество Cu [179, 180]. В опытах *in vitro* оно может достигать величины 12 ионов Cu на молекулу МТН [181]. Особенно важно отметить, что до сего времени неизвестно, обусловлено ли наличие других металлов физиологическими условиями *in vivo* либо попаданием их в пробу в процессе приготовления препаратов [182].

Особый интерес в этом плане представляет потенциальная возможность МТН связывать ионы Fe . Как показали М. Good и М.Валяк [183], МТН может содержать до 7 атомов Fe на молекулу белка *in vitro*. Fe^{2+} связывается с МТН существенно слабее, чем Zn , а последний уступает по силе связывания Cu^+ . Поэтому для замены цинка ионами железа в условиях *in vivo* необходимо существенное преобладание содержания доступного Fe либо недостаток Zn .

АпоМТН образует с металлами комплексы состава $M(7)S(20)$, $M(12)S(20)$, и $M(18)S(20)$, где $M = Cd(II)$, $Zn(II)$, $Hg(II)$, $Ag(I)$, $Au(I)$ и $Cu(I)$. Спектры кругового дихроизма и люминесции объяснили детали этого взаимодействия при добавлении металлов к апобелку или цинксодержащему белку. Первые позволили изучить стехиометрические соотношения, зависящие от особенностей структуры. Эмиссионные спектры в области 450-750 нм описаны для МТН с $Ag(I)$, $Au(I)$ и $Cu(I)$. Также получены прямые результаты связывания для меди с МТН в клетках млекопитающих и дрожжей. Каче-

ственные и количественные взаимоотношения, как показали результаты исследований, различны для Ag-МТН и Cu (I) ионов, связанных с МТН. XAFS структурные данные получены для разных МТН, включая связанные с Ag₁₂-МТН и Ag₁₇-МТН. Электроаэрозольная ионизационная масс-спектрометрия раскрывает детали строения структур, образованных при связывании Ag (I) с МТН. Получены масс-спектры свободного от металла апоМТН и Ag_n-МТН (n = 14-18).

Macreadie Ian G. в миниобзоре [184] акцентирует внимание на результатах недавних исследований по структурным аспектам апотионеинов и механизмах связывания МТН с Cu и As, изучении структуры с использованием рентгеновского излучения и абсорбционной спектроскопии, а также моделировании молекулярных механизмов по новым результатам оценки связывания кадмия и мышьяка с МТН водорослей. Исследование молекулярных механизмов и математическое моделирование апоМТН методами молекулярной динамики показали, что существуют структурные особенности после последовательного удаления ионов металлов, которые стабилизированы возможной сетью водородных связей и определяются первичной структурой полипептида. При взаимодействии Cu₆-β-МТН с Cd₄-α-МТН и Cu₆-α-МТН с Cd₃-β-МТН происходит перекомплексование с образованием полиметаллических комплексов в каждом домене, в каждом случае при предпочтительной координации ионов Cu⁺ с бета-доменом. Реакция As³⁺ со свободными от металлов β- и α-доменами МТН заканчивается координацией трех As³⁺ ионов в каждом домене, соответственно, в предложенной тригональной пирамидальной структуре. Кинетический анализ позволил получить параметры для моделирования процесса связывания каждого иона As³⁺. Рентгеноструктурная абсорбционная спектроскопия дала детальную информацию о координации абсорбируемого элемента. Авторы комбинировали измерение рентгеноструктурной абсорбции эйдж-структуры (XANES) и конечной структуры (EXAFS) с расчетом молекулярной динамики для точного определения металл-тиолатных структур. Эта комбинация методов успешно использовалась для изучения координационной структуры комплек-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

са металлов с 16 цистеиновыми остатками. МТН водорослей связывали шесть ионов Cd^{2+} в двух доменах со стехиометрией нового альфа-кластера Cd_3S_7 и бета-кластера Cd_3S_9 .

Zn и Cu являются физиологически важными микроэлементами для животных [185] и растений [186], обеспечивая многие жизненно важные структурные и каталитические функции белков и ферментов. Zn также выполняет роль регулятора экспрессии генов, в первую очередь, за счет работы транскрипционных факторов, известных как цинк-пальцевидные белки [187]. Большое количество исследований показывает, что именно клеточный гомеостаз Zn регулируется на одной или нескольких стадиях с помощью МТН [188, 189].

Реакционные активности разных тиол/дисульфидных пар в МТН существенно варьируют, так как стерические эффекты в значительной степени влияют на их стабильность и активность. Тиоловые группы в МТН могут отличаться на одиннадцать порядков по величине констант устойчивости металлических комплексов, что эквивалентно различию в 330 милливольт по окислительно-восстановительному потенциалу [189].

Тиоловые группы МТН являются чрезвычайно реакционноспособными, несмотря на их высокую термодинамическую стабильность [190, 191]. Действительно, ионы металлов обеспечивают не только обмен между кластерами, но и участвуют в передаче иона металла от МТН апопротеинам других белков [192]. Поэтому МТН выполняют исключительную роль в связывании и детоксикации поступающего из внешней среды Cd и гашении супероксидных радикалов [193]. Эти белки также вовлечены в процесс перераспределения клеточного Zn [194, 195].

В двух недавних публикациях были сравнены МТН мыши и антарктической рыбы нототении (*Notothenia coriiceps*) [196]. Результаты показали, что под влиянием температуры произошла модификация структуры металл-тиолатных кластеров этих МТН, что способствовало разной реактогенности этих белков (мобильность Zn выше у рыб). Далее, методом гомо- и гетероядерного магнитного резонанса

нанса (ЯМР-спектроскопии) было найдено несколько существенных отличий в сравниваемых МТН [197]. Хотя архитектура этих белков очень близка, отсутствие 9-го остатка цистеина в α -домене МТН рыбы меняет ориентацию петли из 4-х аминокислотных остатков по отношению к таковой у млекопитающих. Кроме того ЯМР-спектроскопия показала существенные различия в динамике поведения этих МТН, касающиеся обмена ионов металлов в β -домене, который сильнее выражен у рыбы. МТН рыбы оказался менее гидрофобным и более подвижным, чем МТН у млекопитающих [198], что лежит в основе биологических различий этих двух белков. Исследования других авторов с разделенными доменами МТН человека обнаружили существенные различия α - и β -доменов по их химической реактивности и металло-связывающей способности (ёмкости) [199, 200]. Тем не менее, многие аспекты их специфики и процессов связывания металлов остаются недостаточно изученными.

МТН млекопитающих является металлопротеином с выраженными окислительно-восстановительными свойствами. В случае Zn-МТН его окислительно-восстановительная активность обусловлена SH-группами цистеина, которые являются лигандами Zn. При преобладании процессов окисления в клетке цинк отщепляется, а при наличии восстановителей Zn связывается. Функции Zn-МТН изучены в экспериментах *in vitro* с обратимым последовательным удалением ионов цинка и восстановлением цистеина.

Для понимания роли и состояния остатков Cys в белке большое значение имели исследования с помощью методов их дифференциальной химической модификации. С помощью химической модификации оказалось возможным выделить три вида состояний Cys-лигандов в МТН: окисленное, восстановленное и связанное с металлом. Доказательством наличия первого состояния является отсутствие способности тиоловых групп к связыванию ионов металлов (потому что сами тиоловые группы отсутствуют, вместо связей -S-H или -S-Me существуют связи -S-S-, неспособные к связыванию с металлами) и восстановление ее в присутствии восстанавливающих агентов. Существование восстановленного состо-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

яния доказывается при помощи модификации свободных тиоловых групп алкилирующими агентами и последующего восстановления дисульфидов с реактивацией тиоловых групп. Третье состояние – связанное с металлом – является физиологически наиболее адекватным. При этом МТН выполняет роль депозитария и поставщика эссенциальных ионов: Cu и Zn. В зависимости от различных потребностей организма в этих ионах в процессе онтогенеза их удельное содержание в МТН меняется: у плодов и новорожденных белок нагружен Cu, а у детей и взрослых – Zn [179, 201].

Проведенные исследования оказались важным шагом на пути изучения структурных особенностей и функциональных свойств МТН. Кроме того, удалось не только обнаружить в тканях печени *in vivo*, но и препаративно выделить не содержащий металл восстановленный апотионеин (тионеин - T_R) и его окисленный аналог (тионин T_O) [202].

Относительно недавно Vallee et al. [203] сообщили об обнаружении апоМТН в количествах, соответствующих такому для металлизированного МТН в печени, мозгу и почках крыс. Авторы полагают, что уровни тионеина могут быть более значительными, чем это предполагалось ранее. Причем, не содержащий металлов тионеин, по-видимому, выполняет в клетке важные физиологические функции. К сожалению, *in vitro* тионеин является недостаточно стойким и подвергается быстрому окислению и протеолитическому разложению.

Изолированный из ткани МТН часто является гетерогенным по содержанию металлов и степени восстановленности. Поэтому для получения общего содержания белка (тионин + тионеин + металлизированный белок), фракцию низкомолекулярных белков подкисляют и обрабатывают восстановителем с последующим повторным насыщением МТН металлами [204]. Функции Zn–МТН зависят и взаимосвязаны с обратимым связыванием и освобождением ионов цинка и окисления-восстановления остатков цистеина [202]. В экспериментах с выделенным белком освобождение ионов металлов в неокислительных условиях приводит к уменьше-

нию содержания тионеина (T_R), в окислительных — тионина (T_O). Однако, остается неизвестным, какие разновидности белка образуются в этих условиях *in vivo*. Свидетельством наличия тионеина в клетках являются опыты, проведенные на культуре опухолевых клеток [205] и ткани крысы, в которых соразмерное количество МТН и апобелка было найдено методом дифференциальной модификации [203]. Известно, что связанный с цинком цистеин не взаимодействует с тиол-модифицирующими агентами, тогда как удаление цинка из МТН хелатирующими агентами восстанавливает реакционную способность. Однако данный вид исследований не способен выявлять количественно тионин T_O , поскольку цистеин, меченый ABD-F (7-фтор-2-оксо-1,3-дiazол-4-сульфонамид), может быть исследован лишь в присутствии восстанавливающего агента ТСЕР [трис-(2-карбоксиэтил)фосфин]. В то же время реагент на тиоловые группы 6-IAF (6-йодацетамидофлуоресцеин) независимо от присутствия восстанавливающих и хелатирующих агентов позволяет определить МТН, T_R и T_O . Это возможно при использовании в опытах совместно с 6-IAF ЭДТА либо ТСЕР, т.к. разные остатки цистеина находятся в восстановленной, окисленной и связанной с цинком формах [206].

Введение мышам химиотерапевтического средства доксорубицина, вызывающего оксидативный стресс, приводило к гиперэкспрессии МТН, и позволило изолировать из сердечной мышцы мыши частично окисленный МТН [207]. Полное разделение и количественная характеристика восстановленного и нагруженного металлом белка остается важной задачей будущих исследований.

Для определения МТН в нормальной ткани применяют метод дифференциальной модификации, поскольку в печени крысы при нормальных физиологических условиях присутствуют все три вида белка. Умеренный окислительный стресс, вызванный, например, воздействием на культуру клеток Ras¹²-онкогеном, приводит к росту содержания общего и окисленного белка, а также доступного Zn в культуральной жидкости. Таким способом стало возможным определение цинк-связывающей способности МТН (по соотношению

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

МТН / T_R) и степени его восстановленности (по соотношению окислительно-восстановленной пары T_R/T_O).

Такие измерения дают возможность получения информации о доступности клеточного цинка как функции окислительно-восстановительного состояния клетки, и *vice versa*, о возможной роли МТН как предшественника T_R/T_O восстанавливающей пары.

Металлотионеины – преимущественно цитозольные белки, но обнаруживаются и в других клеточных компартментах, в частности, в ядре клеток эукариотов. Свой жизненный цикл МТН завершает в лизосомах, куда он поступает в процессе аутофагоцитоза, и где связывается с ионами железа, подавляя при этом процесс пероксидации, вызываемый свободными ионами Fe [208]. Особенно активно в лизосомах происходит процесс аутофагии окисленного МТН с освобождением ионов металлов и их последующей транслокацией в цитоплазму. Если освобождение ионов металлов из МТН в лизосомах идет не по окислительному механизму, то вероятность связывания МТН с ионами Fe существенно возрастает в связи с их высоким содержанием в указанных компартментах клетки. Механизм взаимодействия МТН с лизосомами, его участники, этапы и условия до сего времени остаются практически не изученными. Не известно также, происходит ли регенерация поступившего в лизосомы МТН.

В целом, приведенные в данном подразделе результаты многолетних исследований позволяют получить достаточно полное представление об общей структуре, гетерогенности изоформ и биофизических характеристиках семейства белков, объединенных общим названием «металлотионеины». Представители данного семейства обнаружены в прокариотах и эукариотах, что является свидетельством их важной физиологической роли в биосистемах, определяемой прежде всего уникальной двухдоменной структурой, которая позволяет связывать, накапливать, транспортировать и поддерживать гомеостаз ряда биологически важных металлов, в первую очередь – цинка. Поскольку основные структурно-функциональные особенности МТН обусловлены соответ-

ствующими генами, данный аспект проблемы требует краткой характеристики.

3.2. ГЕНОМИКА И ИНДУКЦИЯ СИНТЕЗА МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ

Непосредственно вслед за открытием МТН и его роли в транспорте металлов началось интенсивное изучение возможности и эффективности использования показателя индукции этого белка в тканях как высокочувствительного биомаркера профессиональных и экологически обусловленных интоксикаций тяжелыми металлами, вероятного активного участника в патогенезе отравлений, показателя соотношения повреждающих и защитных механизмов для прогноза вероятных исходов поражений, поиска средств и способов дезинтоксикационных мероприятий. На этом пути было сделано много важных заключений и обобщений. Проблема казалась близкой к своему окончательному решению.

Так было практически до начала 90-х годов прошлого столетия, пока рост объема наших знаний о генетических основах биологической организации и расшифровка геномов все большего числа организмов не привел к необходимости и неизбежности внедрения в биологию и медицину **«Омик-технологий»**, объединяющих достижения современной экспериментальной генетики, химии белка, молекулярной биологии и микроанализа. Они позволили решить ряд принципиально новых задач на основе детального изучения генома у представителей разных биологических видов, избирательного препаративного удаления и введения в генетические структуры гетерогенного генетического материала, функционально взаимосвязанных генов и их комплексов, проведения широкого круга экспериментальных исследований на нокаутных по определенным генам и клонированных животных. Стало возможным дифференцированно оценивать молекулярные события на репликационном, транскрипционном и посттранскрипционных этапах передачи генетической информации и синтеза белка. Это послужило толчком не только для проведения большого количества изящных по своему

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

сценарию и результатам исследований, но и появления новых научных направлений и дисциплин.

Применительно к проблеме изучения структуры и функции МТН принципиальное значение с омик-позиций имеют геномика, протеомика и металломика.

Геномика - раздел генетики, предметом которого является изучение принципов построения геномов, их строения и структурно-функциональной организации, принципов функционирования генома различных организмов с помощью биологических, физико-химических и компьютерных методов.

Ценность геномных подходов состоит в генерировании новых гипотез и может использоваться как инструмент в токсикологических исследованиях для оценки новых химических веществ, лекарственных препаратов и обеспечения химической безопасности. Именно на их основе получила развитие **токсикогеномика**, которая изучает закономерности взаимодействия организма с экзогенными и эндогенно образующимися токсичными веществами и соединениями на клеточном и молекулярном уровне, рассматривает возникающие под влиянием токсических агентов нарушения в структуре ДНК и РНК, процессы экспрессии и репрессии генов, определяет их взаимосвязь со структурно-функциональными нарушениями клеточного гомеостаза в условиях химической агрессии [209].

Геномика, и более определенно, токсикогеномика, уже не могут больше расцениваться просто как новые технологии, так как к настоящему времени накоплен большой опыт их использования как в научных целях, так и на практике для решения обширного круга стандартизованных задач. Использование транскрипционных профилей может позволить различить особенности состава соединений разных классов и их токсичности. Проводимые исследования обеспечивают также понимание пределов чувствительности и воспроизводимости применяемых методов и того, каким образом данные транскриптомики могут интерпретироваться в контексте патологии и оценке других биологических параметров в кли-

нической и экспериментальной токсикологии. Практически в каждом конкретном случае речь идет о процессах, предшествующих, сопровождающих либо завершающихся синтезом белка в клетке.

Белки или протеины (отсюда *протеом* – их совокупность) способны выполнять в клетке и многоклеточном организме в целом самые разнообразные биологические функции: быть ферментами, транспортерами, гормонами, рецепторами, регуляторами и т.п.

Протеомика - направление молекулярной биологии, занимающееся сравнительным изучением клеточных протеомов, т.е. наборов белков данной клетки в данной фазе ее развития в данный момент времени.

Целью анализа в протеомике является определение количества белков, набора составляющих их аминокислот, идентификация составляющих эти белки пептидов, установление взаимосвязи между структурой белка и его функциями, предсказание функциональной роли отдельных белков путем экспериментального сопоставления их качественного и количественного состава в клетке на разных стадиях ее развития на основе высокой пропускной способности современных физико-химических методов исследования с использованием микрочипов.

Типичные стратегии в протеомике базируются на знании генома изучаемого организма и других его элементов. В настоящее время основными инструментами протеомики являются методы двумерного гель-электрофореза в сочетании с масс-спектрометрией для анализа и идентификации белков и составляющих их пептидов.

Важным оружием протеомики является также предварительная экспозиция исследуемого образца с трипсином. Получаемые фрагменты отделяются двумерной высокоэффективной жидкостной хроматографией, идентифицируются с помощью масс-спектрометрии исследованного образца путем сравнения полученных фрагментов с набором белков или пептидов, которые могут быть синтезированы данными организмами, что позволяет произвести идентифика-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

цию белков.

Исследования показали, что в металлопротеинах для осуществления их полифункциональной активности практически равное значение имеют молекула белка (апопротеин) и комплекс входящих в его структуру металлов (комплексующихся с апопротеином на посттрансляционной фазе). Такой комплекс иначе называется **металлумом**. Последнее стало относиться к пулу металлов в организме, объектах окружающей среды и т.п. Изучение такого рода комплексов высокомолекулярных соединений с металлами легло в основу появления нового научного направления в молекулярной биологии, генетике и токсикологии – **металломики**.

Металломика (metallomics) — изучение качественных и количественных закономерностей поступления, транспорта, функционирования, биотрансформации металлов в живых организмах — представляет собой динамично развивающуюся область биологии, главным образом, благодаря тому, что ионы металлов играют ключевую роль во многих биологических процессах. Эта концепция была в достаточной мере аргументирована, в том числе, и в связи с открытием МТН, постепенным раскрытием его ключевых позиций в транспорте ионов одно- и двухвалентных металлов, поддержании гомеостаза цинка и протекании детоксикационных процессов в клетках и тканях, органах и системах, организме в целом [210].

Становление и развитие токсикогеномики, протеомики и металломики существенно повлияло на развитие наших представлений о структуре и функции металлсодержащих белков в биологических системах. Именно с развитием перечисленных новых научных направлений связаны достижения последних десятилетий в изучении металлопротеинов.

В течение довольно длительного времени делались попытки охарактеризовать развитие (эволюцию) МТН. Любое соответствие (структурное, биохимическое или функциональное) белков млекопитающих и других биологических видов позволяет сделать вывод об их эволюционном единстве. Прецизионные исследования показали, что МТН беспозво-

ночных, грибов и растений показывают высокую разнородность в количестве остатков аминокислот и их последовательностей. Ограниченность современных знаний о происхождении и дифференциации МТН могут быть объяснены, главным образом, недостаточным количеством сравнительных исследований между МТН млекопитающих и представителей других биологических групп. Поэтому более перспективными в этом плане полагают исследования МТН у рыб, амфибий и птиц, с последующим сопоставлением их с МТН млекопитающих. В частности, изучение МТН пернатых представляет большой интерес в эволюционном плане, поскольку этот вид теплокровных позвоночных возник 310 млн. лет тому назад и развивался параллельно с млекопитающими [211].

Клеточный ответ на действие ксенобиотиков начинается с транскрипции генов [209]. Индикация этого процесса позволяет предварительно оценить биохимические и биологические механизмы, поврежденные ксенобиотиками, а данные об экспрессии определенных генов могут служить отправной точкой в токсикологических исследованиях. Использование геномных технологий, в частности, предварительная оценка сообщества генов, является инструментом для познания взаимосвязи между экспрессией тех или иных генов, действием определенных химических соединений и их токсичностью. Такие исследования набирают силу. Если имеется хорошая корреляция между экспрессией генов и конкретным механизмом токсичности, геномные исследования служат дополнительным (вспомогательным) свидетельством справедливости именно данного механизма [212; 213; 214]. Даже если механизм неизвестен, геномика помогает найти компоненты (ферменты, белки), которые вовлечены в изучаемый биологический процесс [215]. Развитие баз данных о профилях экспрессии при действии токсических веществ делает возможным развитие статистических и компьютерных методов индикации токсического потенциала лекарств и токсикантов в зависимости от изменения экспрессии генов в опытах *in vitro* [216; 217; 218] или в системах *in vivo* [219].

Цыплята (*Gallus gallus*) являются образцовыми организ-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

мами для изучения молекулярной биологии птиц, а ген скМТН был признан типичной моделью для исследования МТН птиц [220]. СкМТН был изолирован и первично охарактеризован в начале 1970-ых. Причем, было показано, что он незначительно отличается от изоформ МТН-1 и МТН-2 млекопитающих (мышь) [221, 222]. СкМТН был идентифицирован как полипептид с 63 аминокислотными остатками, с 68%-ым подобием последовательности и двумя аминокислотами вставками относительно МТН-1 мыши [223]. Относящиеся к скМТ сДНК [224] и гены [225] также показали большое структурное и функциональное подобие с МТН млекопитающих. Система МТН, как и ген скМТН, показали наличие идентичного экзон D интрон распределения и, очевидно, регулируются теми же самыми *cis*-элементами, отвечая на те же самые стимулы: перегрузка металлами, окислительный стресс, глюкокортикоиды и липополисахариды [226, 227]. Исследования других видов птиц (*Meleagris gallopavo* (индейка), *Phasianus colchicus* (фазан), *Colinus virginianus* (перепел) [228]; *Cairina moschata* и *Anas platyrhynchos* (утки) [229]; и *Coturnix coturnix* (перепел) [230]), показали удивительное сохранение уникальной формы МТН с сохранением аминокислотной последовательности при 97%-ой идентичности на сДНК уровне. Описанные у *Columba livia* (голубь) две изоформы МТН, последовательности которых не совпадали с МТН млекопитающих, явились уникальным свидетельством разнообразия в геноме, а, следовательно, разнообразия аминокислотных последовательностей среди МТН птиц [231].

Помимо исследований по сравнительной геномике, большие возможности в изучении изоформ и гетерогенности структуры МТН у различных видов открывают препаративные методы современной молекулярной биологии, генетики и протеомики. К настоящему времени клонировано 19 изоформ, обнаруживаемых у человека, 11 из которых, как известно, функционально активны (МТН-1А, МТН-1В, МТН-1Е, МТН-1F, МТН-1G, МТН-1H, МТН-1M, МТН-1X, МТН-2А, МТН-3 и МТН-4) [232].

Увеличение числа изоформ МТН у человека по сравнению с другими млекопитающими, (например, с грызунами, у

которых синтезируются только 4 изоформы МТН, как это видно на рис. 17) несомненно имеет определенное биологическое значение. Одним из возможных ответов на этот вопрос может быть гипотеза, что изоформы были функционально дифференцированы в процессе эволюции для решения различных экологических задач [233].

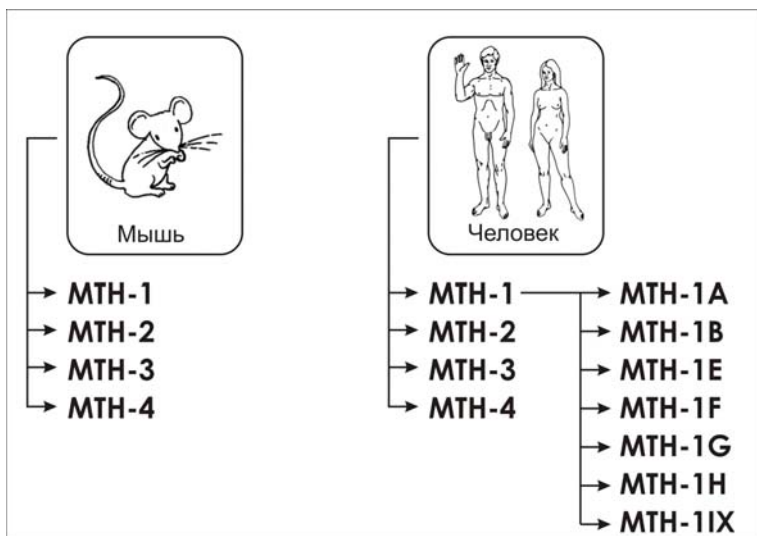


Рис. 17. Функциональные гены изоформ МТН у мыши и человека [по 233].

Тем не менее, еще мало известно о функциях отдельных изоформ МТН. Чтобы прояснить функциональные различия между изоформами МТН человека, N. Miura и S. Koizumi разработали метод определения мРНК отдельных изоформ МТН с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. С помощью этого метода авторы изучили реакцию генов разных изоформ МТН при действии тяжелых металлов (Zn, Cd, Cu) и мышьяка (As) на HeLa клетки. Эти металлы индуцировали все изоформы МТН, кроме МТН-1А с медью, хотя уровни индукции были различными. Кроме того, так как исследованные металлы индуцировали преимущественно изоформы МТН-2А и МТН-1Х, предположили, что именно указанные изоформы могут иметь решающее значение в защите клеток от токсического дей-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

ствия. Тем более, что уровень экспрессии генов этих изоформ в тысячи раз превышает таковой у генов других изоформ МТН (табл. 10).

Таблица 10
Базовый уровень экспрессии генов изоформ МТН в клетках линии HeLa [по 233]

Изоформа МТН	Уровень экспрессии генов (количество копий сДНК \pm S.E./мкг РНК)
МТН-1А	2,2 \pm 0,4
МТН-1В	15,1 \pm 3,0
МТН-1Е	222 \pm 12,1
МТН-1F	1709 \pm 91,2
МТН-1G	8,9 \pm 3,7
МТН-1H	2,1 \pm 1,1
МТН-1X	168833 \pm 4449
МТН-2А	1985333 \pm 68957
МТН-3	1,5 \pm 0,0
МТН-4	8,8 \pm 5,2

Геном млекопитающих содержит гены МТН, различающиеся особенностями регуляции. В промоторной зоне генов выявлены повторяющиеся девятинуклеотидные последовательности (“мотив TGCGCTCGG” или его варианты), наличие которых необходимо для индукции образования МТН в присутствии металлов. Если синтетические копии повторяющихся девятинуклеотидных элементов вставить в промоторы других генов, то их экспрессия также начнет зависеть от присутствия металлов. Природа непосредственного сигнала (вероятно, вызванного действием белкового комплекса с металлом) и ответственного за активацию гена, остается невыясненной. Промоторная зона содержит также “GC-мотивы”, по-видимому, обеспечивающие конститутивный уровень экспрессии гена. Кроме того, в составе промотора содержится регуляторный элемент, отвечающий за активацию некоторых металлотионеиновых генов стероидными гормонами - глюкокортикоидами. В принятой схеме действия стероидных гормонов предполагается, что в клетках имеются специфические белки-рецепторы, которые после присоединения к ним гормона-эффектора способны взаимодействовать с геном, индуцируя или усиливая транскрипцию. Были выявлены участки, ответственные за гормонозависимую регуляцию. Последовательность, включающая 15 нукле-

иновых кислот и расположенная в положении - 250 от кэп-сайта, отвечает за индукцию гена металлотионеина человека глюкокортикоидами. Сложная мозаика цис-действующих регуляторных сигналов в виде перемежающихся коротких “нуклеотидных мотивов” выявлена в промоторной зоне генов, кодирующих МТН млекопитающих [234]. Таким образом, промоторная область гена МТН представляет собой мозаику регуляторных сигналов в составе ДНК, с которыми взаимодействуют специфические белки.

Всего же синтез МТН обеспечивается семейством из не менее чем 12 генов. Большинство генов МТН расположено в одном локусе хромосомы 16 (16q13) [235]. Все гены МТН разделены на 5'-фланговый регион (5'UT), 5'-нетранслируемую область (5'UTR), 3 экзона кодирования, отделенных 2 интронами, и 3'-фланговый конец. Область 5'UT содержит регулирующие элементы, и среди них одна или более копий металл-чувствительного элемента (MRE) [236], который действует как центр связывания для формирования белкового фактора транскрипции (MTF-1) [237], регулирующего экспрессию генов МТН.

Успешную попытку визуализации сложного процесса генной регуляции синтеза МТН сделали S.R. Davis, и R.J. Cousins [238] (рис. 18). Эта графическая модель демонстрирует многофакторный набор стрессоров, которые выступают в роли стимулов экспрессии генов МТН (от АКФ и других свободных радикалов, гормонов, интерлейкинов, до физической травмы и микробной инфекции) подчеркивает регуляторную роль поступающего в организм с пищей Zn, а также объясняет практически все физиологические функции МТН и патологические последствия их нарушения такой единой схемой.

Согласно этой схеме процесс экспрессии генов МТН включает ряд компонентов. К ним относятся такие, как: 1. металлозависимый элемент (MRE), который активируется белковым фактором транскрипции (MTF-1), приводимый в действие поступающим с пищей цинком, 2. глюкокортикоидный эффектор (GRE), 3. активирующие белки STAT (сигналь-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

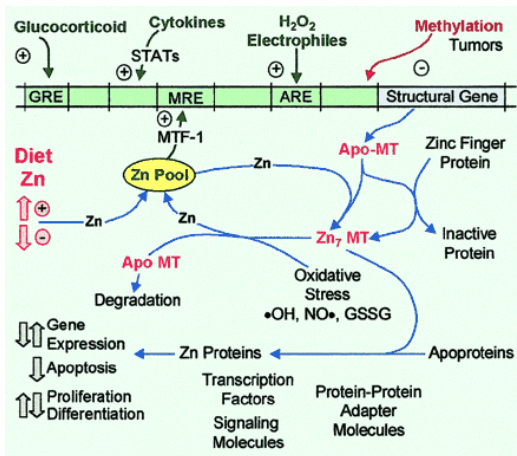


Рис. 18. Генная регуляция функций МТН [238].

ные датчики и активаторы транскрипции) через сигнализацию цитокинов; 4. антиоксиданты (или электрофилы), элементы, ответственные за восстановительный потенциал клеток (АРЕ). Метилирование также может нарушать регуляцию экспрессии некоторых видов опухолевых клеток.

На клеточный пул цинка влияет его поступление с пищей, а также активность транспортеров цинка, обеспечивающих апоМТН цинком. Zn_7 -МТН (все координационных мест заняты) обладает высокой термодинамической стабильностью и одновременно достаточной кинетической лабильностью, что позволяет системе апоМТН/ Zn_7 -МТН активно связывать поступающий в клетку микроэлемент и одновременно служить донором Zn практически для всех его потребителей в клетке.

Дегградация апоМТН происходит быстрее, чем Zn_7 -МТН. Поэтому металлизированный МТН служит еще и своеобразным клеточным депо Zn для последующего обмена и снабжения цинком самых различных металлопротеинов (в том числе факторов транскрипции, сигнальных молекул и транмиттеров, которые используют цинковые пальцевидные белки в осуществлении межбелковых взаимодействий). Все это обеспечивает возможность МТН влиять на ключевые процессы, происходящие на клеточном уровне, в том числе регуляцию генов, пролиферацию и дифференцировку клеток, сигналы трансдукции и апоптоз, а также участвовать в защите организма от оксидативного стресса и вызванных электрофилами повреждений клеток. Однако все эти позиции

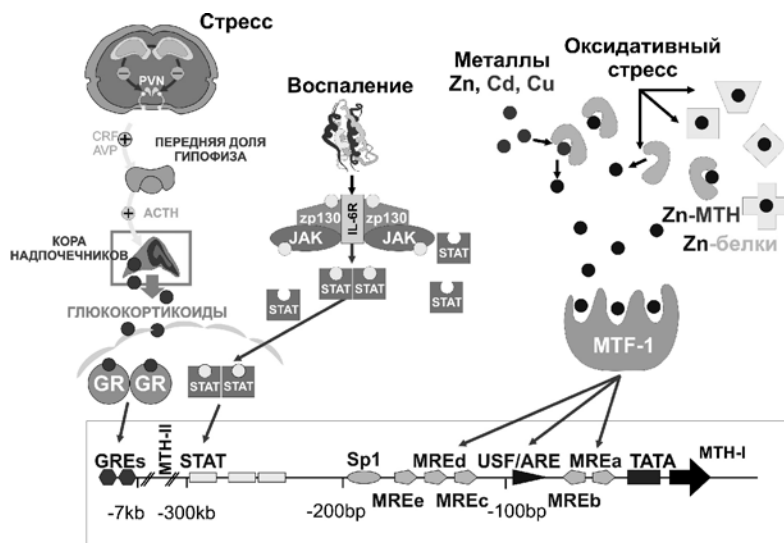


Рис. 19. Регуляция индукции синтеза МТН [240].

требуют дальнейшего экспериментального подтверждения.

Важным признаком генов МТН-1 и МТН-2 является быстрая индукция их транскрипции *in vivo* и *in vitro* факторами, от которых защищает МТН. Существенным для индукции тяжелыми металлами являются цис-последовательности, названные металлическими элементами реакции (МРЕ) [239]. Эти элементы стереотипно выполняют сигнальную роль для запуска прямых и опосредованных реакций индуктивного синтеза МТН и других участников формирования антистрессорного комплекса (рис. 19).

Физиологический синтез МТН и увеличение концентрации МТН происходит достаточно быстро, возрастая в несколько раз во время пролиферации клетки. МТН обменивается цинком с цинксодержащими пальцевидными белками *in vitro* и, следовательно, играет роль в цинкзависимых процессах, включаемых в экспрессию гена. Для индуцированной тяжелым металлом транскрипции МТН-1 и МТН-2 необходим металл-регулирующий фактор транскрипции 1 (МТФ-1) [241, 242]. Этот транскрипционный фактор активно реагирует на поступление в клетку токсичных металлов, что было проде-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

монстрировано на примере Cd [243] на рис. 20.

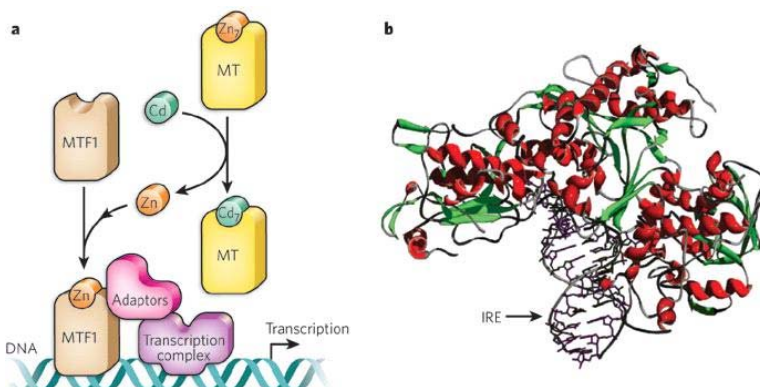


Рис. 20. Сравнение функциональной активности транскрипционных факторов, регулируемых эссенциальными металлами (а. Действие Zn-зависимого транскрипционного фактора MTF1; б. Действие Fe-зависимого транскрипционного фактора IRP1

Транскрипционный фактор MTF-1 взаимодействует с кадмием *in vivo* опосредовано, через MTH, из которого при связывании кадмия освобождается цинк. Последний захватывается пальцевидным сайтом MTF-1, который взаимодействует, в свою очередь с металлсвязывающим элементом мРНК через передаточный белок. Интересно, что *in vitro* такой процесс не происходит.

Механизм участия MTH в транскрипции (а одновременно и процесс индукции синтеза MTH с обязательным участием MTF-1) является характерным в осуществлении регуляторных функций разными эссенциальными металлами. В частности, подобный механизм используется клетками в обмене железа. Железозависимый белок IRP1 подобно MTF-1 выполняют свою функцию регуляции синтеза ферритина с участием железорегуляторного элемента IRE, соединяясь с участком 5'-нетранслируемой области ДНК ферритина. Связывание IRP1 с этим участком ДНК приводит к ингибированию трансляции ферритина. Этот процесс имеет чрезвычайную биологическую важность, так как он обеспечивает поступление, сохранение и выход железа из клетки, а также

синтез гема [244].

Недавно стало очевидным, что MTF-1 играет роль в регулировании транскрипции генов, вызванной различными стрессогенными факторами и, вероятно, вносит вклад в некоторые аспекты злокачественного роста клетки. Механизмы, которыми металлы регулируют транскрипцию МТН через MTF-1, пока не известны. Кроме того, доказано, что MTF-1 – жизненно необходимый ген, поскольку мыши-мутанты без гена MTF-1 погибают вследствие дегенерации печени [245].

Отравление клеток организма тяжелыми металлами сопровождается накоплением МТН благодаря усилению транскрипции его гена (в культурах клеток описаны случаи амплификации гена, определяющего их устойчивость к ядам).

МТН найдены в организмах практически всех эукариотов. Они регулируются преимущественно на посттранскрипционном уровне. У человека доминирующим геном МТН является hMTN-2A, который составляет около 50 % всех форм МТН, экспрессируемых в культуре клеток человека. Промотор hMTN-2A весьма сложен. В дополнение к *cis*-активной последовательности ДНК, которая служит связывающим сайтом для *trans*-активных факторов, таких как Sp1, AP1, AP2, AP4, и рецептора глюкокортикоидов, он содержит восемь согласованных элементарных последовательностей, ответственных за связывание металлов. В ходе дальнейшего исследования ДНК-связывающих белков, которые взаимодействуют с иницирующей последовательностью hMTN-2A гена, был обнаружен белок молекулярной массой 120 кДа, который взаимодействует с геном МТН, тогда как другие белки из тех же клеток HeLa (BPIA, RAD1 и др.) не регистрировались с этим сайтом.

Было проведено клонирование гена, кодирующего последовательность белка, иницирующего связывание hMTN2A. Чтобы клонировать белок в 120-kDa из клеток HeLa в культуре *in vitro*, использовали метод сравнения с фрагментами ДНК, содержащими множественные копии hMTN2A. Было выделено 12 клонов и проведен анализ аминокислот-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

ной последовательности фрагментов с 1054 остатками аминокислот. В результате был опознан клон белка PZ120, названный клоном 1021 [246]. Он образует специфичный подвижный комплекс с иницирующей последовательностью гена hMTN-2A, обладающий ДНК-связывающей способностью, и по системе обратной связи репрессивно влияющий на процессы транскрипции, трансляции, а также пространственную структуру (главным образом, фолдинг или сворачивание белка МТН). В регуляции этих процессов на стадии транскрипции в механизмах биогенеза важная роль принадлежит также микроРНК [247].

Дальнейшие исследования с привлечением современных методов анализа позволили не только определить точки взаимодействия (59 и 39 окончания клона 1021), но и провести анализ последовательности и показать, что первым в нуклеотиде расположен метионин, вероятно, принимающий участие в процессах метилирования ДНК. Эти данные также явились важным свидетельством получения полностью раскодированной сДНК гена hMTN-2A. Белок был назван PZ120 и, как было показано на следующем этапе на основе анализа мРНК белка, он относится к семейству цинксодержащих пальцевидных белков. Он содержит 12 C₂H₂ цинксодержащих «пальцев» (аминокислотные остатки с 571-й по 963).

Хотя этот белок экспрессируется в самых различных тканях, но в печени человека он экспрессируется в наименьшей мере. Его главная функция – репрессия промотора hMTN-2A и участие в осуществлении МТН его регуляторной роли в клеточном метаболизме. Это явилось подтверждением того факта, что в синтезе и регуляции МТН принимают участие не только иницирующие, но и репрессирующие факторы, действующие на основе разных, в том числе и геномных, механизмов и связанные отнюдь не только с регуляторной ролью атомов цинка. В частности, и белок PZ120 оказался полифункциональным. Он осуществляет связь, как с N-, так и с C-концом кодирующей hMTN-2A ДНК и проявляет репрессирующее действие и вне сферы влияния цинксвязывающего домена.

Следует подчеркнуть, что ген hMTN-2A ответственен за большинство экспрессируемых в тканях человека форм МТН [210]. Высокий базальный уровень экспрессии гена hMTN-2A сочетается с его высокой индуцибельностью, что делает оценку его активности достаточно легкой. Поэтому он является идеальной моделью для изучения регуляции транскрипции в клетках эукариотов. Кроме того, имеются данные, что уровень содержания hMTN-2A в клетках может регулироваться путем возрастания числа генов [248], метилированием ДНК [249] или посттранскрипционными реакциями [250]. Основным механизмом регуляции в значительной мере зависит от уровня инициирования транскрипции генов [251].

После клонирования гена hMTN-2A отмечено взрыво-подобное возрастание числа исследований по идентификации *cis*-активных последовательностей ДНК в промоторе hMTN-2A, ответственном за исходную и индуцируемую транскрипцию. Многие лаборатории начали интенсивно проводить идентификацию *trans*-активных белков, которые взаимодействуют с соответствующими *cis*-активными последовательностями ДНК. Белок PZ120 стал важным недостающим звеном в системе регуляции синтеза и функционирования МТН. Процесс выделения этого белка-репрессора проходил ряд последовательных стадий. Они сформировали систему доказательств его геномных функций, которые являются типичными в процедуре работы с геномным материалом и достаточно иллюстративными. Поэтому на них целесообразно остановиться подробнее.

Вначале была проведена идентификация белка, который связывает иницирующую последовательность гена hMTN-2A. Ранее разные авторы идентифицировали несколько специфических ДНК-связывающих активных сайтов, ассоциированных с участком, иницирующим транскрипцию гена hMTN-2A [254, 255].

Гетерогенность изоформ возникает большей частью в результате посттрансляционных модификаций и/или изменений в составе металлов [252]. Наиболее широко экспрессируются, представленные в различных органах и тканях

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

изоформы МТН-1 и МТН-2, которые являются также наиболее индуцибельными. На базовом уровне (в интактном организме), МТН-2 экспрессирован больше, чем МТН-1. Изоформы МТН-3 и МТН-4 найдены главным образом в мозге [253], почках [254] и репродуктивных органах [255] (МТН-3) и в клетках сквамозного эпителия [256] (МТН-4).

При поступлении токсического агента *in vivo* индукция МТН наблюдается в первую очередь в печени [257], причем там синтезируются преимущественно изоформы МТН-1, МТН-2. Однако, и другие клетки и ткани, включая лимфоциты, моноциты, и лимфоидные ткани, например, тимус, могут также синтезировать МТН при адекватном стимулировании [258, 259]. МТН-3 индуцируется в мозге в ответ на окислительный стресс [260].

Индукция изоформ МТН при экспозиции Cd и Zn была определена методом жидкостной хроматографии высокого разрешения [261]. Крысам вводили Cd (1-100 мкмоль/кг) или Zn (0,1-10,0 ммоль/кг) и измеряли концентрации МТН-1 и МТН-2 в печени, почке, и поджелудочной железе через 24 ч. У контрольных крыс был обнаружен в печени только МТН-2, а в почках были обнаружены обе изоформы. Введение Cd во всех дозировках увеличивало синтез МТН в печени таким образом, что концентрации МТН-1 и МТН-2 были приблизительно равны. Индуцированное Zn (100-1000 мкмоль/кг) увеличение концентрации МТН-2 было приблизительно в три раза выше, чем МТН-1, но более высокие дозировки уравнивали концентрации изоформ.

Цинк и медь являются физиологическими индукторами МТН. Другие индукторы активны в большей или меньшей степени как стресс-агенты. Цинк стабилизирует молекулу МТН, усиливает ряд ее функций, противодействуя эффектам ионов ТМ или свободным радикалам, токсинам и ксенобиотикам. Связывание МТН цинка позволяет этим белкам играть ключевую роль в клеточном окислительно-восстановительном метаболизме и взаимодействовать с физиологически релевантными молекулами за счет динамичных Zn-тиолатных связей [262]. Именно раскрытие данного взаимодействия

обусловило прогресс в изучении механизмов выполнения МТН своих физиологических функций по клеточному транспорту Zn, выработке энергии клетками, защите организма от оксидативного стресса и нейродегенеративных заболеваний.

Синтез МТН также индуцируется некоторыми органическими соединениями, в основном с преобладающим гепатотоксическим действием. Механизм индукции синтеза МТН органическими реагентами до конца не изучен. Можно предположить, что в основе его лежит оксидативный стресс.

Влияние перорального введения цинка на взаимодействие между цинком и медью, а также локализация и концентрация МТН были изучены в печени и почках 26 (LEC) крыс-самцов (животные мутанты, 5 недель). Крысы, получавшие ацетат цинка по 80 мг ежедневно внутривентрикулярно, и контрольные крысы были выведены из эксперимента после 1 или 2 недель. Иммуногистохимическими и аналитическими химическими методами было показано, что крысы, которым вводили цинк, имели более высокие уровни МТН в клетках печени и почек по сравнению с контрольными. Концентрации цинка в тканях были значительно более высокими у экспериментальных крыс по сравнению с контрольными, тогда как концентрации меди уменьшились в печени и почках. Уровни МТН также уменьшались с увеличением времени после экспозиции. Гистохимическими методами с использованием автофлуоресценции Cu-МТН показано, что после 2 недель сигнал уменьшался и в печени, и в почках. Эти данные позволяют лучше понять механизм обмена меди в этих двух тканях, а также предположить, что цинк конкурирует за поглощение на просветной стороне кишечного эпителия и вызывает синтез МТН [263].

Одним из мощных индукторов МТН является также селен. В эксперименте показано, что если у контрольных мышей в печени содержалось $2,47 \pm 0,90$ мкг МТН/г влажной ткани, то у мышей, которым давали $ZnSO_4$, содержалось $8,15 \pm 2,20$ МТН/г влажной ткани печени, а у мышей, получавших солод, содержащий селен, $12,80 \pm 1,44$ мкг МТН/г влажной печени [264]. Таким образом, селен является более мощным

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

индуктором МТН, чем $ZnSO_4$ в его диапазоне эффективных доз и может рассматриваться как новый индуктор МТН.

В работе О.А. Громовой et al. [265] описана способность церебролизина (FPF-1070) стимулировать продукцию МТН-1 в коре головного мозга крыс при экспериментальной транзиторной очаговой ишемии. Транзиторная очаговая ишемия вызывалась 30-минутной окклюзией общей сонной и правой средней мозговой артерий. Экспериментальной группе крыс вводился FPF-1070 в дозе 10 мкг/г веса внутривенно за 1 час до начала окклюзии артерий. В коре головного мозга крыс, подвергавшихся ишемии, уровень мРНК МТН-1, определявшийся с помощью ПЦР, увеличился в 8, а МТН-2 - в 7,8 раз. При введении FPF-1070 уровень МТН-1 возрос в 16,2 раз, МТН-2 - в 16,5 раза. Данные результаты свидетельствуют о том, что нейропротекторный механизм действия церебролизина при ишемии мозга обусловлен повышенной продукцией нескольких белков, включая МТН-1. Возможность индукции синтеза МТН лекарственными препаратами хотя и находит освещение в литературе, но требует систематизации и дальнейшего уточнения, поскольку множественный характер функциональной активности МТН может приводить к непрогнозируемым, в т.ч. отрицательным, эффектам.

Известно, что синтез МТН *in vivo* и *in vitro* индуцируется различными факторами, например, тяжелыми металлами [266], оксидативным стрессом, четыреххлористым углеродом [267], лекарствами от рака, продолжительным голоданием и курением. М. Penkowa и Р. Keller et al. [268] описали индукцию синтеза металлотioneина в скелетных мышцах при повышенной физической нагрузке.

Наиболее мощными индукторами МТН являются катионы ТМ. Например, кадмий и цинк способны повышать уровень МТН в печени до 100 раз. Другие ТМ, включая Au, Bi, Cu, Co, Hg, Fe, In, Mn, Ni, Pt – также способны индуцировать рост транскрипции МТН в различной степени в зависимости от вида ткани и ее физиологического статуса. Физические стрессоры также повышают уровень синтеза МТН в 5-10 раз,

воспалительные агенты (например, ЛПС) или провоспалительные цитокины стимулируют экспрессию МТН в печени в 10-20 раз. Важно подчеркнуть, что, во-первых, этот эффект прослеживается в опытах *in vitro* и *in vivo*, во-вторых, индукция МТН ионами ТМ имеет выраженную тканевую и изоформную специфичность [269].

Как было указано ранее, активация процесса транскрипции модулируется металлзависимым специфичным транскрипционным фактором – МТФ-1. С другой стороны, даже такие слабые индукторы МТН, как Mn, Ni, Co, Fe, Se, V существенно повышает уровень МТН в печени. К этому можно добавить известный факт повышения уровня Zn-тионеина в печени крыс после экспозиции свинцом. Подобная информация представляет большой интерес не только с позиций установления ассортимента детоксицируемых с участием МТН ионов металлов, но и в плане изучения механизмов индукции синтеза апоМТН с позиций геномики. В этом плане большое значение имеют исследования группы авторов во главе К. Кобаяши и Дж. Ю (Япония) [270, 271]. Авторами были проведены изящные препаративные экспериментальные исследования, которые существенно углубляют наши представления о характере взаимодействия МТН с ТМ и другими стрессорами. Всю их совокупность можно условно подразделить на 3 группы. В первую входят кадмий, медь, ртуть и цинк, которые реагируют с генами МТН и вызывают их экспрессию в различных органах и тканях. Вторая группа включает широкий спектр металлов, которые не влияют непосредственно на процесс трансляции в хромосомах. К ней относятся вышеупомянутые марганец, кобальт, железо, ванадий, т.е. типичные металлы с переменной валентностью, а также свинец. В третью группу входят преимущественно органические стрессоры, которые изменяют число и доступность активных тиоловых групп.

Различие в действии представителей перечисленных групп индукторов МТН четко прослеживаются при анализе экспериментальных данных, полученных вышеупомянутыми авторами при сравнении индукции МТН в печени и почках мышей. Так при экспозиции животных металлами первой

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

группы имело место нарастание уровня МТН в печени и почках одновременно с активацией МТФ-1 не только при воздействии 4 перечисленных ионов, но также серебра и висмута. Вторая группа также индуцировала синтез МТН *in vivo*, но практически не изменяла его уровень *in vitro* в первые часы экспозиции. Последующая индукция МТН под действием этих металлов носила, как правило, воспалительный характер, что сопровождалось резким увеличением синтеза провоспалительных цитокинов, особенно IL-6. Интересно, что индукция МТН отсутствовала при действии $MnCl_2$ на трансгенных мышшей, нокаутных по IL-6.

При в/б введении мышам ацетата свинца в дозах 100-300 мкмоль/кг отмечалось повышение уровня IL-6 в плазме крови уже через 3 часа после введения токсиканта. Поскольку IL-6 является достаточно мощным индуктором МТН в печени, авторы считают, что именно указанный цитокин, продукция которого вызвана свинцом, ответственен за повышение уровня МТН в печени. Кроме того, наблюдаемые изменения уровня МТН могут быть связаны с известным фактом повышения экспрессии транспортера цинка в печени (ZIP14), модулируемого IL-6. Это могло приводить к усилению потока цинка в гепатоциты с последующим синтезом МТН у экспонированных свинцом мышшей. Однако этот альтернативный вариант ограничивается фактором времени, поскольку индукция IL-6 отмечается уже в первые часы эксперимента.

Большой интерес представляет тот факт, что индуцируемое свинцом повышение содержания мРНК МТН в почках не может быть объяснено механизмом с участием IL-6, описанным выше для печени. Поскольку концентрация свинца в почках была очень низкой, можно полагать, что в основе роста индукции мРНК лежит другой механизм. В этом плане речь может идти не о других цитокинах, а, например, о протеинкиназе С, которая активируется свинцом и индуцирует мРНК МТН в почках.

Следует согласиться с авторами в оценке разнонаправленного характера действия свинца на синтез апоМТН и мРНК МТН: первый угнетается, а второй возрастает. Эти

данные убедительно свидетельствуют о подавляющем действии свинца на синтез МТН в почках на посттранскрипционном этапе. Элементы такого расхождения имеют место и при действии других металлов. Даже при экспозиции такими облигатными почечными ядами, как кадмий и ртуть, корреляции между экспрессией мРНК МТН и МТН в почках не установлено. Это подтверждает гипотезу о преимущественном воздействии токсичных металлов на синтез МТН в почках на посттранскрипционном этапе.

Приведенные данные представляют несомненный интерес в плане изучения процессов синтеза МТН в различных органах с позиций функциональной обусловленности, а также как иллюстрация потенциальных возможностей, открываемых токсикогеномикой для решения проблемы физиологии и патологии МТН.

В основе индуцированного синтеза могут лежать механизмы непосредственного влияния действующих факторов на транскрипцию мРНК и посттранскрипционный синтез МТН, а также сложные, многокомпонентные реакции с вовлечением ряда вспомогательных белков, в первую очередь, шаперонов [272]. Медиаторами такой индукции (ее вторичными месседжерами) являются свободные радикалы [273], липополисахариды (ЛПС) [274], оксиды азота (NO), стрессорные гормоны - глюкокортикоиды [275], гамма-излучение [276], УФ-излучение [277], радиация [278], некоторые провоспалительные цитокины, такие как интерлейкины IL-1, IL-6 [279], фактор некроза опухолей α -TNF, интерферон γ -IFN [280, 281], алкилирующие агенты [282]. Эти факторы обладают синергическим действием на процесс экспрессии МТН. Уровень синтеза белка существенно изменяется в зависимости от вида ткани и комбинации факторов [281, 283, 284, 285]. Так например, весьма многочисленные данные свидетельствуют о том, что свободные радикалы кислорода могут активировать экспрессию МТН различными путями, включая прямую стимуляцию антиоксидантного ответа в области промотора, а также непрямую, за счет элементов, ассоциированных с вторичными месседжерами протеинкиназы [286, 287]. Такие индукторы вызывают экспрессию генов МТН у мышей в раз-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

ных органах (печень, почки, головной мозг, легкие, сердце, кишечник, селезенка, поджелудочная железа, яичник) [281].

Первичным индуктором синтеза МТН в клетках помимо двухвалентных ТМ могут быть и экзогенные белки. В частности показана взаимосвязь между индуцированной экспрессией прионового белка в культуре клеток и индукцией МТН [288]. При этом отмечалось существенное изменение локализации внутриклеточного обмениваемого цинка в эндосомах. Авторы считают, что последнее отражает дисрегуляцию цинка и его содержания в клетке как следствие индукции МТН. Этот факт может играть определенную роль в патогенезе прионовых заболеваний. Таким образом, индукция МТН может не только следовать, но и предшествовать изменению внутриклеточной индукции цинка. Кроме того, важно помнить, что индуктивный синтез МТН, вызванный не цинком, может влиять на биодоступность обмениваемого пула цинка («свободного» цинка).

Особенности индукции МТН прослежены в различных органах и тканях применительно к воспалительным процессам. При радиационных поражениях тонкой кишки, приводящих к образованию свободных радикалов (ROS) и развитию острого воспаления, одновременно происходит индукция МТН [289].

Приведенные в настоящем подразделе данные представляют интерес по ряду позиций. Во-первых, они показывают сложность процесса экспрессии генов МТН, синтеза белка и вклад в эту геномную программу большого числа основных и вспомогательных участников. Во-вторых, они свидетельствуют о важной роли МТН у представителей практически всех биологических видов животных, растений и микроорганизмов в эволюционной динамике его множественных форм. В-третьих, продемонстрировано участие в осуществлении и регуляции функций МТН достаточно многочисленных кофакторов белковой природы, в том числе инициаторов, индукторов и репрессоров. Остается также актуальным вопрос о соотношении и распределении функций МТН, его взаимодействия с другими транспортными

белками в процессе обеспечения клеток ионами металлов, регуляции их гомеостаза и последующей элиминации.

Биологические функции МТН и их физиологическая значимость все еще остаются недостаточно изученными. Например, было показано, что несмотря на отсутствие синтеза МТН-1/-2 у трансгенных, нокаутных по этим белкам мышей, они в условиях обычной жизнедеятельности остаются в удовлетворительном состоянии. В связи с этим критическая значимость биологической роли МТН была подвергнута сомнению [290]. Дальнейшие исследования геномики и протеомики МТН несомненно позволят ликвидировать этот пробел.

Приведенные данные подтверждают тезис о необходимости проведения дальнейших разноплановых исследований по проблеме изучения роли МТН в клеточном метаболизме, функциях и гомеостазе при различных физиологических и патологических процессах и состояниях с учетом последних достижений молекулярной биологии, геномики, протеомики и металломики.

3.3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ И ИММУНИТЕТ

В большей части опубликованных обзоров, руководств и монографий по иммунотоксичности справедливо обращается внимание на влияние ксенобиотиков на неспецифическую (общую) резистентность организма и собственно систему иммунитета, ее клеточную и гуморальную компоненты. Именно эту триаду П.Ф. Забродский [291] относит к предмету иммунотоксикологии. Если же рассматривать эти позиции во взаимосвязи с МТН, то последний представляет интерес и в четвертом самостоятельном аспекте проблемы, а именно в плане его включения в нормальные физиологические процессы, протекающие с участием вышеупомянутых иммунных систем.

Взаимосвязь МТН с иммунной системой прослеживается достаточно четко в процессах дифференцировки, роста и развития практически всех иммунокомпетентных клеток, а также широкого круга миелоидных клеток, макрофагов,

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

плазмоцитов, эпителиоцитов и др. видов клеток, активно участвующих, как в формировании иммунного ответа, так и в процессах адаптации и реакциях клеточных систем на действие широкого круга профессиональных и экологических факторов. В этой связи необходимо напомнить, что существует обширная информация об индукции синтеза МНТ при действии УФ-лучей, ионизирующей радиации, изменений температуры окружающей среды, широкого круга химических и биологических воздействий, в т.ч. патогенных микроорганизмов и ТМ, которые одновременно являются иммуноактивными факторами.

Как известно, экспрессия МТН часто не связана с металлами и их соединениями. Это является важным аргументом в пользу существования физиологической функции (функций) МТН, не связанных напрямую с металлотранспортом. К числу вероятных направлений в поисках гипотетических функций можно причислить обеспечение клеточного метаболизма активными тиолами, а также активацию иммунокомпетентных клеток и обеспечение реакций антиген-антитело.

Хорошо известно, что тяжелые металлы изменяют иммунные функции путем влияния на различные механизмы клеточного метаболизма [292]. В то время как определенные токсичные ТМ (например, Cd, Pb) могут снижать адапционные иммунологические функции экспонированных людей [293], другие (такие, как Cu, Zn) являются эссенциальными для проявления иммунореактивности организма. Существует еще одна группа, включающая небольшое число металлов (например, Hg, Be, Gd), которые могут инициировать неадекватные иммунные реакции, приводящие к аутоиммунным заболеваниям [294]. Изучение вовлеченных в этот процесс участников, приводящих к различным эффектам, медиаторами которых являются ТМ, представляют определенную ценность, как для оценки вероятных последствий экологических воздействий, так и для познания фундаментальных молекулярных механизмов, лежащих в их основе. Основные результаты недавних разработок касаются также роли МТН в осуществлении иммунных функций. В частности, изучено воздействие комплекса гистосовместимости при

хронической бериллиевой болезни, влияние свинца на экспрессию цитокинов, модуляция сигнала каскада трансдукции ртутью, и генетические механизмы, которые задействованы в иммунном процессе при отравлении тяжелыми металлами.

Как правило, метилртуть, кадмий, свинец вызывают иммунотоксические эффекты в дозах, которые превышают их фоновый уровень в крови человека. Fortier M. et al. [295] в опытах *in vitro* изучали влияние смеси этих металлов и их индивидуальное действие на иммунокомпетентные клетки — лейкоциты периферической крови человека. Использовали концентрации MeHg^+ (33-200 мкг/л), Cd^{2+} (3,1-16 мкг/л) и Pb^{2+} (75-207 мкг/л). MeHg^+ в этих концентрациях вызывала пролиферацию лимфоцитов, что проявлялось в поглощении ^3H -тимидина и цитотоксической активности природных киллеров, определяемой по реакции с диоктадецилкарбодицианином. Полученные результаты свидетельствуют о том, что под влиянием всех исследованных металлов во всех концентрациях уровень внутриклеточных тиолов в лимфоцитах и моноцитах снижается. При концентрации MeHg^+ 120 мкг/л и выше происходит снижение уровня МТН в моноцитах. Существенный рост содержания МТН в лимфоцитах отмечен при низком содержании Cd^{2+} и Hg^{2+} . Авторы полагают, что Hg представляет наибольшую опасность на соответствующих экологических уровнях по отношению к мононуклеарным клеткам крови человека. Эффект Hg был больше в лейкоцитах и природных киллерах, чем в моноцитах, что коррелирует с более высоким уровнем МТН в последних.

Известно, что возникновение иммунного ответа сопровождается физиологическими изменениями не только клеток, непосредственно участвующих в иммунном ответе, но и соседних клеток. В них происходит накопление активных форм кислорода, рост ПОЛ, реактивных разновидностей оксидов азота, а также продуктов клеточного метаболизма и агентов, служащих сигналом к клеточному некрозу и апоптозу. Клетки реагируют на такого рода стрессогенные факторы множеством способов, целой серией различных гомеостатических реакций. К таким реакциям относятся синтез белков теплового шока, цитокинов острой фазы и металло-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

тионеинов. Модуляция уровней МТН, как показано в работе [296], изменяет специфические иммунные функции. Авторы отметили, что карта генов МТН близка к хемокинам Ccl17 и Cx3cl1. Это касается прежде всего активных остатков цистеина, которые присутствуют и в молекуле МТН. Это может свидетельствовать о том, что МТН способен участвовать в процессе хемотаксиса. В описанных экспериментах показано, что иммунные клетки мигрируют за счет хемотаксиса лишь при наличии градиента МТН. Эту реакцию могут специфически блокировать два различных моноклональных антитела анти-МТН. Экспозиция клеток МТН также приводит к быстрому увеличению содержания F-актина. Инкубация Т-лимфоцитов с токсином холеры или токсином коклюша полностью блокирует реакцию хемотаксиса МТН. Поэтому, возможно, МТН действует через G-протеин, связанный с рецепторами и через сигнальный путь ц-АМФ, сигнализирующий об иницировании хемотаксиса. Эти результаты позволяют предположить, что при наличии воспаления, МТН во внеклеточном окружении, возможно, поддерживает полезное движение лейкоцитов к очагу воспаления. МТН играет роль “сигнала опасности”, изменяя характер иммунного ответа, когда клетка испытывает стресс. Повышение уровня МТН при экспозиции ядовитыми веществами или в результате хронической воспалительной болезни, возможно, изменяет нормальные хемотактические реакции, которые регулируют обмен лейкоцитов. Именно поэтому синтез МТН представляет важный фактор в иммуномодуляции, которая связывается с аутоиммунными нарушениями при токсическом поражении.

По мере накопления информации о множественном характере физиологических функций МТН, вовлечения его в различные по своим клеточным и молекулярным механизмам защитные реакции и процессы адаптации в условиях нарастающего физического, химического и биологического стресса, все более актуальной становится проблема интегральной оценки биологической роли данного белка, не только с позиций индикации функциональных нарушений, но и оценки состояния физиологических резервов, определения уровня стрессоустойчивости и рационального управления процес-

сами жизнедеятельности.

В этом плане одним из приоритетных, перспективных, интегральных направлений физиолого-гигиенического мониторинга по изучению изменений состояния организма и клеточных систем в условиях возрастающего антропогенного прессинга является оценка общей неспецифической и иммунологической реактивности с учетом особенностей фенотипа, взаимодействия метаболических и регуляторных механизмов гомеостаза, в реализации которых МТН принадлежит важная роль. При этом он может выступать, как: 1. белок, связывающий с высокой аффинностью тяжелые металлы; 2. фактор, обеспечивающий клеточный гомеостаз цинка; 3. блокатор активных форм кислорода и оксидативного стресса; 4. белок, участвующий в противовоспалительных реакциях; 5. супрессор апоптоза; 6. модулятор реакций антиген-антитело; 7. ингибитор аутоиммунных процессов.

Следует подчеркнуть, что не все перечисленные механизмы являются в достаточной мере изученными и доказанными. Проблема остается актуальной, а имеющаяся информация фрагментарна и накапливается в многочисленных периодических изданиях, что затрудняет ее анализ и обобщение. Поэтому целесообразно хотя бы в иллюстративно-информационном плане в какой-то мере восполнить данный пробел.

Полученные результаты корреспондируются с накапливающимися данными по иммунотоксичности, иммуномодулирующему действию и аутоиммунным реакциям, связанным с вовлечением в биосинтетические и биоэнергетические процессы ионов металлов и металлорганических комплексов [297, 298, 299]. Они затрагивают вопросы синтеза иммуноглобулинов и их специфичности, генетических механизмов образования и функционирования главного комплекса гистосовместимости, регулирующего дифференцировку и специфические взаимоотношения иммунокомпетентных клеток, а также синтеза антител и их взаимодействия с антигенами [300].

И хотя иммунотоксичность соединений металлов пред-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

ставляет актуальную проблему в связи с широким применением металлов в промышленности, на транспорте, в сельском хозяйстве, медицине и в других сферах жизнедеятельности населения, развитие данного направления за последние два десятилетия можно охарактеризовать как этап накопления информации.

В подавляющем большинстве случаев изучался характер воздействия на иммунную систему отдельных представителей этого обширного класса ксенобиотиков [301, 302, 303]. Прежде всего такого рода исследования касаются эссенциальных металлов, которые, с одной стороны, обеспечивают реактивность организма, многообразие средств и способов иммунологической защиты, а с другой – тесно взаимосвязаны с экспрессией МТН в иммунокомпетентных клетках.

Поскольку Zn необходим для нормального функционирования иммунной системы, его дефицит оказывает многоплановое действие как на генетически обусловленный (конститутивный), так и приобретенный (адаптируемый) иммунный статус организма [304]. Поэтому, в частности, развивающийся при старении дефицит цинка коррелирует с иммунологическими изменениями, которые включают снижение активности тимуса и вырабатываемых им гормонов, нарушение баланса между Т-хелперами 1 и 2 типов, снижение чувствительности к вакцинации и угнетение функций генетически контролируемых иммунных клеток. Имеется множество данных о снижении уровня цинка в организме в процессе старения. Однако большинство из них не классифицируют по возрасту, что лишает возможности установления реальных возрастных границ для значимого дефицита цинка с поражением иммунных функций. Поэтому добавление цинка в рацион с целью иммуностимуляции у пожилых людей не всегда бывает эффективным при хронических воспалительных процессах. Авторы считают, что в основе данного явления лежат изменения в функционировании МТН, их способности поставлять клеткам биодоступные ионы цинка. Именно данный механизм может лежать в основе критического дефицита цинка у пожилых людей с выраженным нарушени-

ем иммуночувствительности.

Гомеостаз внутриклеточного цинка регулируется за счет буферной способности МТН и транспортеров Zn (ZnT и ZIP семейств), которые являются медиаторами осуществления внутриклеточным цинком сигнальной функции. Это обеспечивает ему роль вторичного мессенджера в физиологических условиях. В некоторых (подчеркиваем) физиологических ситуациях, например, при старении, которое представляет закономерный биологический процесс с постепенными биохимическими и физиологическими изменениями и возрастающей восприимчивостью к болезням, внутриклеточный гомеостаз цинка изменяется. Последнее обусловлено, в частности, тем обстоятельством, что, несмотря на высокую концентрацию, МТН не способен отдавать цинк, а некоторые транспортеры Zn, ответственные за приток Zn в клетку (семейство ZIP), являются дефектными, приводя к снижению содержания внутриклеточного Zn для обеспечения эффективной работы иммунной системы [305]. Дополнительное поступление в стареющий организм Zn существенно улучшает эти функции. Однако, возможности стареющего организма к усвоению дополнительного Zn ограничены. Они зависят от генетически обусловленного фонда (степени экспрессии) МТН и IL-6. Именно этот фонд МТН взаимосвязан и регулирует как экспрессию мРНК МТН, так и гомеостаз внутриклеточного цинка. Старые люди, имеющие генотипы GG и CC типов (C⁺- носители), продуцирующие высокие уровни IL-6 в локусе IL-6-174G/C, проявляют низкую генетически обусловленную иммунореактивность, отличаются пониженным содержанием внутриклеточного цинка и высоким уровнем МТН. Учет генетически обусловленных вариаций IL-6-174G/C локуса, ассоциированных с изменениями локуса МТН 1A+647A/C, является перспективным регуляторным инструментом в обеспечении стареющего организма Zn.

МТН обеспечивают эффективность иммунного ответа на оксидативный стресс, в том числе за счет активации ими природных киллеров (NK) [306]. Последние, как известно, способны лизировать некоторые типы клеток (в том числе и раковые) в определенных условиях, таких как наличие ионов

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , лимфокинов IL-6. Последние влияют на экспрессию МТН-генов и срочный иммунный ответ на оксидативный стресс и воспаление. Одновременно МТН обеспечивает цинком Zn-зависимые антиоксидантные ферменты, включая поли(АДФ-рибозо)полимеразу-1 (PARP-1), которая включена в процесс восстановления молекул ДНК при дефектах сборки. Эта роль МТН является исключительно важной в молодых организмах, испытывающих стресс, и при воспалительных реакциях. У старых особей, подверженных хроническому стрессу и воспалительным процессам, недостаточность этой функции МТН способствует развитию и поддержанию ряда заболеваний.

Проведенными исследованиями [306] было показано, что у здоровых старых людей уровни мРНК МТН и IL-6 в лимфоцитах высоки. Одновременно имеет место низкая биодоступность ионов Zn, снижена активность природных киллеров и ослаблена способность PARP-1 к репарации ДНК. При этом нарушается выход экстратимических Т-клеток из печени, что взаимосвязано с инволюцией тимуса. Участие МТН в этом процессе подтверждается экспериментами на мышцах с частичной гепатектомией. У молодых особей экспрессия МТН быстро восстанавливалась, что сопровождалось нормализацией клеточного иммунитета. У старых особей также отмечалось повышение уровня МТН за счет его усиленного синтеза вне печени, однако в связи с его большой аффинностью к цинку и инволюцией тимуса, восстановление иммунитета не происходило. Вероятно, для эффективного осуществления иммунных функций необходима слаженная работа всех компонентов системы обеспечения цинком, обеспечивающих взаимодействие эндогенного цинка с МТН, как по уровню, так и по связыванию металлов, включая не только цинк, но и медь [307].

В этой системе важную роль отводят цинку, поступающему в организм с продуктами питания. Именно он запускает каскад противовоспалительных и антистрессорных реакций, протекающих с участием МТН, первая стадия которых осуществляется путем металлизации апоптонеина, и заканчивается иммунным ответом (рис. 21).

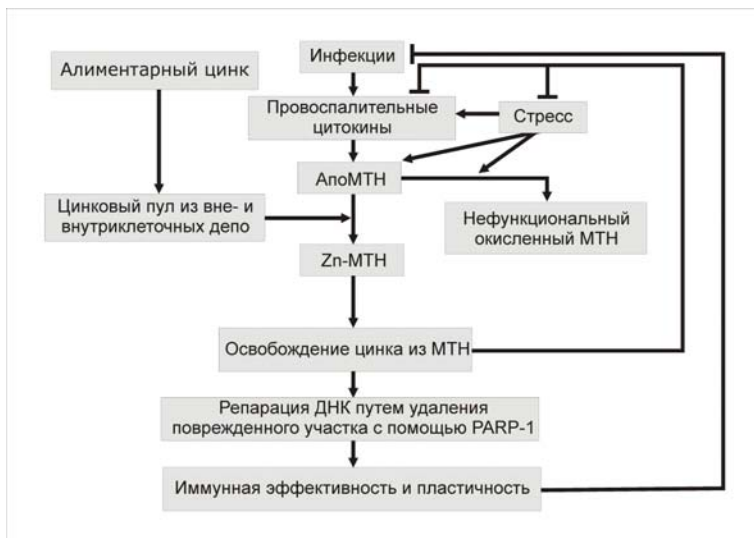


Рис. 21. Участие МТН в иммунных реакциях организма [308].

Изменение данного физиологического защитного каскада обнаружено у пациентов пожилого возраста с инфекционными заболеваниями, но при этом иммунные нарушения были более выраженными. И наоборот, обследованные здоровые столетние индивидуумы характеризовались низким уровнем мРНК МТН, высокой биодоступностью ионов Zn, удовлетворительной активностью NK клеток и высокой репарационной способностью PARP-1. Именно сниженная способность МТН к освобождению Zn лежит в основе повышенной чувствительности пожилых особей к инфекции. Прием в течение месяца ежедневно по 12 мг препаратов Zn представителями этой группы людей восстанавливает активность природных киллеров в организме и другие иммунологические характеристики, обеспечивающие «здоровую старость» и высокую продолжительность жизни.

Способность осуществлять адекватный иммунный ответ на стрессорные воздействия (называемая иммунной пластичностью) является одной из фундаментальных физиологических свойств организма, обеспечивающих «здоровую старость». Для изучения этого явления в экспериментальных

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

исследованиях использовали 2 модели: первая моделировала циркадные ритмы иммунной активности, а другая отражала иммунный ответ регенерируемой печени после частичной гепатектомии. Показано, что иммунная пластичность снижается при старении в условиях нормальной продукции IL-6 за счет нарушения функций связанного с цинком МТН, не обеспечивающего выход достаточного количества ионов металла при старении. Это, в свою очередь, снижает эффективность работы иммунной системы (контролируемой тимусом и экстра тимической). В частности, нарушения взаимодействия печеночных НКТ-клеток с TCR-рецепторами. Прослеживалась зависимость интенсивности процесса от циркадного цикла и иммунной пластичности (зависимой от связанного с цинком МТН). Это проявлялось в продукции НКТ-и НК-клеток у молодых и очень старых мышей, тогда как у старых такой индукции иммунных процессов не наблюдалось.

Приведенные экспериментальные данные корреспондируются с результатами наблюдений за долгожителями в человеческой популяции. Их способность проявлять адекватный иммунный ответ на внешние воздействия определяется: низким содержанием Zn-МТН, удовлетворительной биодоступностью внутриклеточных ионов цинка, большей способностью МТН отдавать цинк, более легким протеканием воспалительных процессов (в связи с низкой экспрессией генов рецептора gp130 для IL-6), ростом уровня γ -интерферона, числа γ, δ -TCR рецепторов НКТ-клеток. Более того, авторы считают, что, в конечном счете, именно полиморфизм МТН обеспечивает у пожилых людей удовлетворительную иммунную пластичность и, как следствие, поддержание здоровья и долгожительство [308].

Взаимосвязь МТН с иммунными процессами не ограничивается формированием физиологического ответа на стрессорные стимулы, а охватывает широкий спектр иммунонезависимых физиологических и патологических процессов. Они охватывают проблемы иммунного гомеостаза, клеточной смерти, канцерогенеза, воспалительных, инволюционных, дизрегуляторных, аутоиммунных и дегенеративных заболеваний. При этом широкие кооперативные взаимосвя-

зи МТН могут быть проиллюстрированы на примере его взаимодействия с белками теплового шока, в частности р53.

Наиболее обширная информация по данному вопросу касается взаимодействия МТН и р53 в канцерогенной трансформации различных видов клеток, а также выработке ими устойчивости к средствам химиотерапии [309, 310, 311]. Этот аспект проблемы более подробно изложен в разделе, посвященном канцерогенезу.

Иммунореактивность в различной степени дифференцированных и трансформированных клеток изучали путем исследования взаимодействия с антителами против белков р53, р21 и МТН [312]. Культура клеток формировалась из биоптатов легких 67 пациентов, экспонированных асбестом, с подозрением на мезотелиому легких. Исследования показали, что иммунореактивность измененных под влиянием асбеста клеток была обусловлена взаимодействием исследованных белков в процессе опухолевой трансформации, что проявлялось в положительной реакции антиген-антитело для белка р53 в 33 %, р21 – 35 %, и МТН – 52 % случаев. Это корреспондировалось с видом контакта (экологический более иммунопозитивный, чем производственный), возрастом и длительностью воздействия, тогда как в выживаемости статистически достоверных отличий в зависимости от иммунореактивности не отмечалось.

Механизм взаимодействия МТН с белками теплового шока и р53 вероятнее всего определяется посттрансляционной модификацией и белок-белковым взаимодействием. В первую очередь это касается белка р53, который относится к категории супердинамичных вследствие легкости конформационных изменений в различных физиологических и патологических ситуациях. Именно эти свойства обуславливают его функциональную активность как супрессора апоптоза, химического мутагенеза и оксидативного стресса. Среди недавно обнаруженных активаторов посттрансляционной модификации р53 ведущую роль играет протеинкиназа-2 (H1PK2). Повышение ее активности под влиянием стрессоров приводит к дисфункции р53, активации апоптоза и дисфол-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

дингу растворимых β -амилоидных пептидов, что приводит к их отложению в клетках. Деградация HIPK2 нарушает конформацию p53 и ускоряет процесс солидизации растворимых β -амилоидов с потенциальной угрозой развития болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний.

Поскольку p53 является также транскрипционным фактором, участвующим в прямой индукции процесса экспрессии генов, ответственных за остановку клеточного цикла, репарацию ДНК, старение и апоптоз клеток, посттрансляционная модификация p53 является стимулом для отбора генов-мишеней. Регулятором этого процесса также является HIPK-2. Механизм регуляции ею активности p53 при апоптозе состоит в фосфорилировании N-концевого серина-46 (Ser46) и ацетилировании C-концевого лизина (Lys382). При этом многочисленные генотоксические агенты могут активировать HIPK-2, а условия гипоксии приводят к разрегулированию активности протеинкиназы-2 в условиях канцерогенеза. Все вышеизложенное свидетельствует о важной роли HIPK-2 в активации/инактивации функциональной активности p53 и связанного с ним МТН, хотя механизмы этого влияния и пути реализации регуляторных изменений остаются недостаточно изученными [313].

Раскрытие многокомпонентных цепей клеточной регуляции низкомолекулярными белками, кооперативно связанными с МТН, увеличивает количество факторов и условий, влияющих на стабильность генома и его изменение под влиянием повреждений ДНК, обусловленных химическими веществами, ионизирующей радиацией и экспрессией онкогенов [314]. Кооперативный характер носят взаимосвязи МТН с цитокинами острой фазы (такими как IL-1), фактором некроза опухолей (α -TNF), рецепторами плазматических мембран иммунных клеток, лимфоцитов и макрофагов. При этом отмечены защитные и промоторные свойства у экстрацеллюлярного МТН. В частности, МТН может ингибировать функциональную активность Т-лимфоцитов (CTL), осуществляющих цитолитический распад патологически измененных клеток [315].

В этих процессах МТН принадлежит важная роль. Она определяется функцией контроля гомеостаза эссенциальных и токсичных металлов. Поэтому появляется все больше данных о неоднозначности этой биологической функции МТН: с одной стороны речь идет об участии МТН в процессах детоксикации при металлопатиях, а с другой – экспрессия его генов и последующая индукция синтеза в опухолевых клетках усиливает их резистентность к действию ТМ, широко применяемых в химиотерапии рака. Тесная взаимосвязь этой двуединой роли МТН с иммунными процессами в организме наиболее четко прослеживается на примере иммунотоксичности металлсодержащих химиотерапевтических препаратов.

Так, Di Gioacchino M. et al. [316] исследовали иммунотоксичность элементов группы платины (платина, палладий, родий), а также титана и мышьяка в связи с их широким применением в медицинской практике. Авторы исследовали воздействие этих металлов на врожденные и адаптивные элементы иммунной системы и их свойства, в частности, на пролиферацию клеток, продукцию цитокинов, функциональное состояние мононуклеарных клеток периферической крови и образование активных форм кислорода нейтрофилами. В результате исследований было установлено, что иммунотоксичность проявляли только некоторые соединения Ti (титаноцен, аскорбат и оксалат Ti). Соединения трехвалентного As (арсенит натрия, хлористый тетрафенилмышьяк) обладали большей иммунотоксичностью, по сравнению с другими исследованными As-содержащими препаратами. Очень важным было выявление различий в проявлении иммуно- и генотоксичности, которые ранее рассматривались практически как одно целое. Генотоксичность изменялась в следующем порядке: Pt > Rh > Pd, тогда как иммунотоксичность — Pd > Pt > Rh.

Лимфоциты и макрофаги проявляли различную реакцию, по сравнению с нейтрофилами, в ответ на действие токсичных металлов, что согласуется с гетерогенностью их защитных функций и соответствующих им механизмов. Авторы пришли к заключению, что иммунотоксичность метал-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

лов во многом зависит от разновидностей исследуемых соединений и их физико-химических свойств. При этом большие трудности возникают при оценке токсико-кинетических аспектов при оценке иммунотоксичности некоторых металлов. Это связано, прежде всего, с недостатком информации касательно существования и значения различных форм, разновидностей и сложностью аналитических методов для их определения в биологических объектах.

В течение длительного времени исследователи полагали [317, 318], что непосредственной мишенью действия таких стойких экологических токсикантов и иммуномодуляторов, как ртуть и свинец, являются иммунокомпетентные Т-клетки, в частности, подкласса Т-CD4, т.е. Т-хелперы. Однако, проведенные исследования [319] показали, что Т-CD4 (+) клетки являются важным функциональным, но все же косвенным компонентом иммунной реакции в ответ на экспозицию свинцом. Для обнаружения прямых взаимосвязей свинца в иммунной системе и изучения потенциальных механизмов развития вызванной им иммунотоксичности, были оценены миелоидные клетки-супрессоры MSCs по их способности модулировать быстрое увеличение числа CD4 (+) Т-клеток после воздействия Pb.

Следует напомнить, что клетки MSCs регулируют адаптивный иммунный ответ, в том числе и путем ингибирования пролиферации CD4 + Т-клеток [320]. Полагают, что механизм этого MSC-зависимого регулирования включает образование биологически активного оксида азота (NO), который блокирует сигнальные каскады иммунокомпетентных клеток, зависящие от рецептора IL-2, и таким образом препятствует входу Т-клеток в клеточный цикл. В смешанной культуре лимфоцитов (MLC), увеличение числа MSCs подавляет пролиферацию Т-клеток по дозозависимому принципу. Эта супрессия снимается при воздействии Pb уже в концентрации 5 мкмоль/л. Ингибирование NO-синтазы (NOS), приводит к росту пролиферации Т-клеток в культуре MLC. Более того, Pb снижает продукцию NO в культуре MLC клеток. Способность Pb нарушать продукцию NO прослежена на производной от MSC линии MSC-1 клеток при различных воздействиях, таких как

введение в культуру интерферона- γ (IFN- γ), липополисахаридов (LPS), а также на стимулированных конковалином А спленоцитах. Однако, ни избыток белка, ни повышение уровня мРНК для индуцибельной изоформы iNOS не изменялись при воздействии Pb.

В целом, эти данные позволяют предположить, что Pb нарушает MSC-зависимое аллореактивное подавление пролиферации Т-клеток и их функций, но не экспрессии iNOS. Это положение имеет важное значение не только в плане раскрытия биохимических механизмов иммунотоксических и иммуномодулирующих эффектов тяжелых металлов, но и опосредованного участия в них МТН, который тесно взаимодействует с метаболизмом NO при металлоиммунотоксикозах.

Помимо высокоспециализированных в иммунологическом плане Т- и В-клеток, важную роль в иммунном ответе организма и воспалительных реакциях в ответ на микробную инфекцию играют макрофаги (МФ). Мононуклеарные фагоциты представляют третий (после Т- и В-лимфоцитов) тип клеток, непосредственно участвующих в формировании клеточного и гуморального иммунитета [321]. МФ содержат индуцибельную NO-синтазу (iNOS), которая активируется эндотоксинами и цитокинами [322]. iNOS продуцирует NO из аргинина в ферментативной реакции. Кроме того, активированные МФ проявляют аргиназную активность. Этот фермент конкурирует с iNOS в процессе метаболизма аргинина

В результате экспериментальных исследований в 1970-х годах было замечено, что аргинин предотвращает инволюцию тимуса после хирургических вмешательств и увеличивает число лимфоцитов [323]. Кроме того, аргинин, как оказалось, был необходим для адекватного заживления ран [324]. На основе этих наблюдений был сделан вывод об отнесении аргинина к условно незаменимым аминокислотам, которые следует добавлять к рациону во время физического напряжения, после хирургических вмешательств и травм.

В 1987 г. было установлено образование окиси азота из аргинина в эндотелиальных клетках и вскоре после этого

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

в макрофагах. Также было показано, что при воспалении индуцируется экспрессия специфической изоформы NO-синтазы (iNOS) в миелоидных и других типах клеток [325]. Оказалось, что iNOS выполняет разноплановую патогенетическую роль при различных патологических процессах [326]. Индукцию iNOS вызывают сигналы от Т-1 хелперов (Th1), цитокины (IL-1, TNF- α , и IFN) и эндотоксин [327]. Регуляция биодоступности аргинина является потенциальным механизмом, который может управлять и контролировать образование NO. Аргиназа-1 — фермент, который превращает аргинин в орнитин и далее в мочевину. Аргиназа-1 индуцируется в миелоидных клетках Т-2 хелперами (Th2), такими цитокинами, как IL-4 и IL-13, а также IL-6, IL-10, TGF- β , простагландинами (PGE) и катехоламинами. Таким образом, активация iNOS или аргиназы (или обоих ферментов), отражает тип воспалительного ответа в специфичном процессе развития заболевания. Например, сепсис ассоциирован с доминированием iNOS, тогда как при травме преимущественно индуцируется аргиназная активность [328, 329].

Миелоидные клетки, активно экспрессирующие аргиназу, в то же время усиленно захватывают аргинин из окружающей среды. С помощью данного механизма миелоидные клетки подавляют зависимые от аргинина функции и вследствие этого названы соответственно миелоидными клетками-супрессорами (MSC). MSC были описаны при травмах (у мышей и людей), некоторых инфекциях, и, особенно существенно, при раке [330, 331]. У людей, экспрессия аргиназы наблюдается главным образом в гранулоцитах, которые могут, в свою очередь, проявлять подавляющий эффект, хотя и отмечается существенное различие между их разновидностями. Однако моделирование на мышах по-прежнему продолжает поставлять новые важные знания относительно регуляторных эффектов экспрессирующих аргиназу клеток.

Т-лимфоциты зависят от аргинина при осуществлении различных ключевых функций, включая такие, как пролиферация, экспрессия TCR-комплекса, пептидов z-цепи, а также развитие памяти. Вскоре после травмирующего стимула MSC вторгаются в маргинальные зоны селезенки (Т-клетки). MSC

также встречаются в некоторых опухолях [331, 332]. Т-клетки, выращиваемые в культуре вместе с MSC, проявляют молекулярные и функциональные эффекты, связанные с дефицитом аргинина. Пациенты, получившие травмы, или больные раком проявляют отклонения Т-клеток от нормы, включая снижение пролиферативной способности и потерю особенностей z-цепи, обусловленные дефицитом аргинина. В патологических условиях аргиназа-1 может выходить из не иммунных клеток, приводя к дефициту аргинина. Это, в частности, отмечается при выходе аргиназы из клеток в результате некроза гепатоцитов, гемолиза, что ведет к ненормально низкой продукции NO, несоответствующей вазоконстрикции, снижению кровоснабжения органов и тканей, легочной гипертензии [333].

Аргинин является субстратом как iNOS, так и аргиназы. До вступления в реакцию с участием iNOS он должен попасть во внутриклеточное пространство. Этот процесс осуществляется с участием катионного транспортера аминокислот (CAT-2) и является основным механизмом поступления аргинина в цитоплазму МФ [334].

Однако обычно поступающего аргинина недостаточно для проявления полной активности аргиназой и iNOS [335]. Поэтому аргиназа, iNOS и CAT-2 сами стимулируют продукцию NO. Последний тесно взаимодействует с МТН и металлами, поскольку: 1. МТН участвует в детоксикации NO и снижает чувствительность клеток к этому интермедиату [336]; 2. Продукция NO модулируется в присутствии металлов [337]; 3. NO выступает в роли медиатора, посредника и регулятора индукции синтеза МТН [338]; 4. NO, предположительно [339], может реагировать с МТН *in vitro*, приводя к выходу металлов из МТН и тем самым повышая их биодоступность в клеточных компартментах для широкого круга метаболических реакций.

Хотя многие аспекты взаимодействия МТН и NO остаются недостаточно изученными, имеются веские основания для поддержания гипотезы о наличии посреднических функций МТН по отношению к NO. Так, показано [340], что МТН

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

выступает положительным регулятором экспрессии α -TNF, IL-1, и IL-6 в перитонеальных МФ у мышей [341]. Снижение продукции цитокинов обнаружено у МТН-нулевых мышей в ответ на введение липополисахаридов. Вероятно, МТН модулирует функциональную активность МФ или продукцию ими цитокинов. В частности, этими исследованиями была проверена и подтверждена гипотеза, что МТН-недостаточность у МТН-0 мышей вызывает снижение продукции NO, а поэтому противобактериальная активность МФ-клеток также снижается в ответ на введение ЛПС или стимуляцию α -TNF.

Многогранный характер участия МТН в обеспечении функциональной активности иммунокомпетентными и вспомогательными клетками подтверждается все новыми исследованиями. Так, T. Miyayama et al. [342] показали, что МТН повышает поступление в клетку Cu и обеспечение этим металлом Zn,Cu-СОД (СОД-1) клеток млекопитающих, в том числе и прежде всего, иммунокомпетентных путем взаимодействия с шаперонами и другими регуляторными и транспортными белками. В частности, ответственный за переход меди из цитоплазмы в молекулу СОД-1 шаперон меди CCS блокируется в нокаутных по МТН клетках, что приводит также к существенному снижению экспрессии мРНК внутриклеточного транспортера меди Ctr1. Добавление в среду инкубации нокаутных по МТН мышинных фибробластов (МТ-КО клеток) малых сигнальных, стимулирующих экспрессию МТН и CCS, молекул РНК (siРНК), приводило к повышению уровня меди в цитоплазме до такового в обеспеченной МТН линии фибробластов (МТ-WT-клетки).

Одновременно впервые было показано, что в этом сложном процессе клеточного гомеостаза меди участвует еще один белок, выводящий Cu из клетки транспортер Atp7a, который присутствует, как в МТН-WT, так и в МТН-КО клетках. Индукция его синтеза специализированной для Atp7a белка siДНК повышает уровень выведения Cu из обоих видов клеток в 3,0 и 2,5 раз, соответственно. Процесс высоко специфичен, так как индукция синтеза другого белка-транспортера этого семейства, Atp7b, не влияла на выход Cu из

клеток.

Авторы пришли к выводу, что ведущую роль в процессах клеточного гомеостаза меди в макрофагах и их предшественниках играет МТН, так как обогащение им клеток обоих видов (МТН-WT и МТН-КО) МТН, даже при снижении уровня ССС до 0,30-0,35 от контрольных значений, приводило к нормальной экспрессии и активации СОД-1, важного участника в осуществлении макрофагами, Т- и НК-киллерами противовоспалительной и антистрессорной (антиоксидантной) функций.

3.4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ И ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС

Среди универсальных механизмов реагирования клеток и тканей на изменяющиеся условия окружающей среды ведущая роль, безусловно, принадлежит оксидативному стрессу. В генерировании активных форм кислорода и свободных радикалов отразилась способность биообъектов к мобилизации энергетических ресурсов для активации и организации системы защиты от широкого круга физических, химических и биологических факторов, экзогенных и эндогенных воздействий. Процессы образования АКФ происходят в здоровом организме в нормальных физиологических условиях [343].

Свободные радикалы обеспечивают поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза в организме, формируют ответные реакции на стрессорные воздействия, стимулируют иммунную реактивность, участвуют в регуляции проницаемости мембран, сосудистого тонуса, процессах роста, дифференциации, старения клеток и организма в целом. Научное направление о биологическом окислительно-восстановительном регулировании получает все большее развитие в биохимии, молекулярной биологии и генетике.

Нарушение баланса между образованием различных видов АФК (свободных радикалов, перекисных соединений) и способностью клетки к их связыванию и «гашению» приводит к возникновению широкого круга патологических процес-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

сов. Не случайно, в настоящее время этот патогенетический механизм, наряду с воспалением, гипоксией, мембрано- и ферментопатиями, относят к числу наиболее универсальных.

В то же время, без нарушения баланса между прооксидантными и антиоксидантными системами оксидативного стресса не существует (рис. 22). Вероятно, именно разнообразие стрессогенных стимулов, их качественная и количественная гетерогенность, как и временной диапазон, в процессе эволюции биосферы привели к появлению значительного арсенала антиоксидантов и их объединению в функциональные системы. АОС клетки представлена низкомолекулярными соединениями – ловушками радикалов (витамины А, С, Е и К, биофлавоноиды), низкомолекулярными тиолами (глутатион и эрготионеин), аминокислотами, пептидами и белками, а также антиперекисными ферментами (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, каталаза и др.) [344].

Активация АОС, в том числе поступающими от свобод-



Рис. 22. Состояние равновесия про- и антиоксидантных систем организма.

ных радикалов сигналами, во многом определяет приспособление (адаптацию) организма к изменяющимся условиям окружающей среды. При срыве адаптивных механизмов развивается патологическое состояние, которое определяется в итоге взаимоотношением прооксидантных и антиоксидантных механизмов, иными словами, способностью АОС защитить клетку от избытка свободных радикалов и перекисей. Понимание процессов, позволяющих клетке справиться с эндогенным или экзогенным оксидативным стрессом, имеет большое научно-теоретическое и практическое значение, т.к. раскрывает закономерности реактивности биосистем, взаимодействия организма и среды обитания, может помочь в диагностике, лечении и профилактике различных патологических состояний и заболеваний.

Поэтому не случайно с момента открытия МТН было обращено внимание, прежде всего на его роль не только в транспорте тяжелых металлов, но и защите клеток от оксидативного стресса. В силу наличия большого числа SH-групп, способных к достаточно легкому окислению, а также биодоступного цинка, МТН выступает активным антиоксидантом, он способен нейтрализовывать АФК, в первую очередь, гидроксильные радикалы.

Многочисленными исследованиями последних лет [345, 346] получено большое количество убедительных аргументов в пользу наличия у МТН выраженных антиоксидантных свойств. Высказываемые разными авторами рабочие гипотезы и предлагаемые концептуальные модели строятся, по преимуществу, на признании роли цинка и тиоловых групп в антиоксидантной активности МТН. Так, W. Feng et al. [347] на основании данных, полученных *in vitro*, считают, что в условиях оксидативного стресса МТН освобождает цинк, что сопровождается окислением сульфгидрильных групп и формированием дисульфидных связей. Опыты, в которых имеет место индукция МТН под влиянием различных стрессоров, могли бы ответить на этот вопрос, однако не ясно, не влияют ли индукторы МТН также на другие известные антиоксидантные системы.

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

И все же механизм антиоксидантного действия МТН, несмотря на не снижающееся количество публикаций, на сегодня до конца не выяснен.

Интересное исследование по выяснению механизма антиоксидантного действия МТН провел Р. Еск [348]. Он изучал действие обогащенного кислородом воздуха на индукцию МТН и обмен Zn у крыс при различных уровнях этого микроэлемента в рационе. Самцы крыс альбиносов находились на очищенной диете (крахмал кукурузы, яичный белок, сахароза и масло сои), с разной концентрацией Zn (1; 20; 100; 500 мг Zn/кг пищи). При содержании Zn в рационе 1 мг/кг, у крыс развивался визуально и биохимически наблюдаемый дефицит Zn. В конце 37-дневного получения животными диеты, половина крыс поместили в камеры со 100 % содержанием O₂ в воздухе на 12 ч, т.е. в окислительную среду. Дыхание чистым O₂ приводило к значительному снижению концентрации Zn в плазме крыс с достаточным уровнем Zn и пропорционально уменьшила ее у крыс с недостатком Zn. Концентрация МТН увеличивалась в печени, почках и легких в группе с избытком Zn в рационе. Вдыхание чистого O₂ привела к росту содержания МТН в печени в двух группах (100 и 500 мг Zn/кг диеты). Изменение концентрации Zn в плазме и уровней МТН в печени при введении избытка O₂ указывает на более важную роль МТН в распределении Zn и его взаимодействиях с другими микроэлементами для поддержки антиоксидантной емкости, чем на прямую нейтрализацию свободных радикалов. Это очень важный вывод, потому что, по мнению многих ученых, антиоксидантный эффект МТН по механизму схож с эффектом глутатиона и заключается в нейтрализации свободных радикалов за счет SH-групп.

Масштабное исследование по определению влияния известных индукторов МТН на антиоксидантные ферменты печени, которые защищают клетки от оксидативного стресса, проведено М.В. Iszard [349]. Самцам крыс вводили хлорид кадмия (30 мкмоль/кг), хлорид цинка (1000 мкмоль/кг), α-гедерин (АГ, 30 мкмоль/кг) или липополисахарид (ЛПС; 1 мг/кг) за 24 ч до измерения активности АОС. Zn и α-гедерин вызывали рост концентрации GSH в печени на 20 % и 55 %,

соответственно. Cd значительно увеличивал, а ЛПС уменьшал активность селен-зависимых глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР). На активность глутатион-S-трансферазы (Г-S-T) не влиял ни один из индукторов. Cd, Zn и α -гедерин снижали активность каталазы (КА) на 20-35 %, в то время как активность СОД при воздействии индукторов не изменялась. Общая активность цитохрома P450 и цитохрома b5 снижалось при действии ЛПС, Cd и α -гедерина, и практически не изменялось при действии Zn. Активность P450, измеренная по уровню окисления тестостерона, также уменьшалась при действии ЛПС, Cd и α -гедерина.

Таким образом, все четыре исследованных индуктора МТН воздействуют на системы защиты клетки от оксидативного стресса. Это свидетельствует о наличии сложных взаимоотношений МТН с другими антиоксидантами, вероятно, характеризующихся не только синергизмом, но и образованием единой системы защиты клеток от оксидативного стресса, в том числе и на генетическом уровне. Так, при инициированном Cd стрессе существует два основных пути реакции организма – экспрессия генов синтеза МТН и GSH [350].

Ответ на оксидативный стресс, как правило, носит кооперативный характер, в котором участвуют разные антиоксиданты. Это, в частности, было подтверждено в опытах с клонированием комплементарных ДНК (кДНК), кодирующих МТН и СОД из печени камбалы (*Paralichthys olivaceus*) [351]. Молекула кДНК МТН состоит из 183 пар оснований (п.о.) и кодирует белок из 60 аминокислот, частично клонированная кДНК СОД состоит из 326 п.о. и кодирует белок из 109 аминокислот. Авторы исследовали дозы и время эффектов, связанных с генерированием стресса полициклическим ароматическим углеводородом (бенз[а]пиреном) на экспрессию мРНК МТН и СОД с использованием количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Уровни экспрессии мРНК МТН были наиболее высокими через 24 ч экспозиции (примерно в пять раз) при концентрации бенз[а]пирена 10 мкг/л, и через 6 ч (примерно в двенадцать раз) при 30 мкг/л. Уровни экспрессии мРНК СОД были наиболее высокими через 12

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

и 6 ч, соответственно. О стрессорном характере воздействия свидетельствовало существенное ($p < 0,05$) повышение уровня глюкозы и кортизола в плазме крови. Авторы делают правомерный вывод о согласованном участии МТН и СОД в гашении (детоксикации) АФК, генерировавших под воздействием бенз[а]пирена, и таким образом могут быть использованы как информативные биомаркеры оксидативного стресса и купирующих его антиоксидантных систем.

В литературе активно обсуждается взаимодействие МТН в процессе защиты от оксидативного стресса с белками-шаперонами, в первую очередь, с хорошо изученным белком р53, который одновременно обладает супрессорными свойствами по отношению к опухолевым клеткам. В этом плане само заболевание выступает в качестве индуктора оксидативного стресса, а пациент является не только объектом для оценки взаимодействия между различными протекторами, обладающими антиоксидантными свойствами, но и получает объективную прогнозную информацию. В качестве иллюстрации к данному положению можно рассмотреть результаты исследования, проведенного Н.Е. Hamouda et al. [352] среди больных с неосложненным язвенным колитом (группа 2) и пациентов с дисплазией слизистой (группа 3), в сравнении со здоровыми добровольцами (группа 1 – контроль). У всех обследованных (45 человек) в сыворотке крови иммуноферментным методом определяли антитела к белку

Таблица 11
Сравнение изучаемых показателей по обследованным группам [352]

Показатель	Группа 1, n =15	Группа 2, n =15	Группа 3, n =15	P
AOPP (мкмоль/л)	128,95 ± 3,06	145,94 ± 29,86	192,21 ± 46,71	< 0,002 < 0,001 < 0,001
GSH (мкмоль/л)	2,49 ± 0,10	1,87 ± 0,02	1,37 ± 0,09	< 0,05 < 0,05 < 0,05
МТН (мкг/мл)	6,12 ± 0,25	8,18 ± 0,35 9	9,20 ± 0,58	< 0,05 < 0,05 < 0,01
p53Abs (U/мл)*	9,42 ± 1,64	20,19 ± 3,20	34,66 ± 1,34	< 0,001 < 0,001 < 0,001

Примечания: AOPP – продукт окисления белка; GSH – восстановленный глутатион; МТН - металлотионеин; p53Abs – антитела к белку р53.

p53 (p53Abs) и МТН, а также продукты оксидативной деградации белков (advanced oxidation protein products - AOPPs) и восстановленный глутатион (GSH) спектрофотометрическим методом. Результаты представлены в табл. 11.

Из приведенных в таблице данных видно, что у больных язвенным колитом содержание AOPP в сыворотке возросло на 35,6, а с признаками дисплазии – 49,1 % по отношению к контролю. При этом уровень GSH снижался на 24,9 и 45,0 %, соответственно. Концентрация МТН в сыворотке возрастала на 33,7 и 50,3 %, а уровень антител к p53 – в 2,1 и 3,7 раза, соответственно. Отмечалась высокая степень парной корреляции полученных величин между собой (табл. 12).

Таблица 12

Парные корреляционные связи между показателями [352]

Сравниваемые параметры	r	P
AOPP (мкмоль/л) and GSH (мкмоль/мл)	-0,385	0,001
AOPP (мкмоль/л) and МТН (мкг/мл)	0,678	0,001
AOPP (мкмоль/л) and p53Abs (U/мл)	0,547	0,001
GSH (мкмоль/л) and МТН (мкг/мл)	-0,662	0,001
GSH (мкмоль/л) and p53Abs (U/мл)	-0,923	0,001
p53Abs (U/mL) and МТН (мкг/мл)	0,739	0,001

Примечания: AOPP – продукт окисления белка; GSH – восстановленный глутатион; МТН - металлотионеин; p53Abs – антитела к белку p53.

Обращает на себя внимание не только наличие тесных парных корреляционных связей между изучавшимися показателями, но и некоторые особенности отдельных пар. Прежде всего, это однонаправленность изменений МТН и p53, с одной стороны, и обратная взаимосвязь по всем позициям с глутатионом, с другой. Интерпретируя полученные авторами интересные и важные данные, можно постулировать следующие концептуальные положения: 1. Наличие выраженного синергизма между МТН и p53 при выполнении ими противострессорной функции. 2. Более высокую чувствительность и меньший потенциал системы GSH/GSSG, которая существенно изменялась в сторону большей окисленности под влиянием патологического стресса и негативно коррелировала с повышенной экспрессией МТН и p53. 3. Следует со-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

гласиться с авторами, что оксидативный стресс и окислительное повреждение клеток при хроническом язвенном колите играют важную роль в патогенезе заболевания. 4. Изменения уровня экспрессии МТН и р53 может использоваться в качестве чувствительных и информативных в прогностическом отношении биомаркеров для раннего обнаружения дисплазии клеток и ассоциированного канцерогенеза.

Эти данные представляют также интерес с позиций оценки роли окислительно-восстановительного потенциала клетки для реализации антиоксидантного действия МТН.

Подобные эффекты МНТ отчетливо проявляются также при терапевтическом использовании лекарственных средств. Так церебролизин известен как препарат, обладающий нейропротекторными, антиоксидантными и нейротрофическими свойствами. Многочисленные фармакодинамические эффекты церебролизина обусловлены присутствием в препарате низкомолекулярной фракции пептидов и L-аминокислот. Целью авторов [265] было обнаружение его способности стимулировать продукцию МТН-1 в коре головного мозга крыс при экспериментальной транзиторной очаговой ишемии. Транзиторная очаговая ишемия вызывалась 30-минутной окклюзией общей сонной и правой средней мозговой артерий. Экспериментальной группе крыс вводился церебролизин в дозе 10 мкг/г веса внутривенно за 1 час до начала окклюзии артерий. В коре головного мозга крыс, подвергавшихся ишемии, уровень мРНК МТН-1, определявшихся с помощью ПЦР, увеличился в 8, а МТН-2 - в 7,8 раз. При введении лекарственного препарата уровень МТН-1 возрастал в 16,2 раз, МТН-2 - в 16,5 раза. Полученные результаты свидетельствуют о том, что нейропротекторный механизм действия церебролизина при ишемии мозга обусловлен повышенной продукцией ряда белков, в том числе МТН-1 и МТН-2.

Однако, хотя антиоксидантное действие связывают, главным образом, с универсальными изоформами МТН (МТН-1 и МТН-2), в работе [353] доказана антиокислительная роль МТН-3, который находится преимущественно в

нейронах и астроцитах, характеризующихся высокой функциональной активностью, и показана его способность гасить свободные радикалы кислорода и защищать нервные клетки от оксидативного стресса. Условия для развития последнего весьма благоприятны. Они определяются спецификой окислительно-восстановительного метаболизма в мозгу, который способствует генерированию АФК в нормальных протекающих энергетических процессах. Поэтому количественные показатели содержания свободных радикалов в тканях головного мозга достаточно высоки (табл. 13).

Таблица 13

Содержание свободных радикалов в нервной ткани

Виды свободных радикалов	Концентрации
Перекись водорода	10 – 15 мкмоль/л
Супероксидный анион	10 мкмоль/л
NO-радикал	5 – 10 мкмоль/л
Гидроксильный радикал	< 10 нмоль/л

Из представленных в таблице данных видно, что содержание гидроксильных радикалов поддерживается на наиболее низком уровне вследствие его высокой опасности, что требует тонкой регуляции, осуществляемой именно с участием МТН. Вероятно, это обстоятельство послужило одной из предпосылок появления в мозгу в процессе эволюции специфической изоформы МТН – МТН-3.

К числу вызывающих оксидативный стресс физических факторов в первую очередь следует отнести ионизирующую радиацию и УФ-облучение, которые одновременно являются активными индукторами синтеза МТН. Такого рода эффект зависит от вида клеток, органов и тканей, имеет возрастные отличия и по-разному проявляются в физиологических и патологических условиях.

Возможные механизмы противолучевого действия МТН изучали российские исследователи [354-356]. В частности, установлено, что индукция синтеза эндогенных МТН приводит к увеличению радиорезистентности различных биологи-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

ческих объектов *in vitro* и *in vivo*. Наблюдалась строгая корреляция между содержанием МТН в радиочувствительной ткани (костном мозге) и выживаемостью мышей после облучения. Защитные свойства экзогенных МТН изучены в значительно меньшей степени, хотя низкая токсичность этих белков в комплексе с Zn позволяет предположить, что разработка на их основе противолучевых средств может быть весьма перспективной.

Показано, что Cd, Zn-МТН эффективен при защите биологических молекул и фибробластов от радиации. А.Н. Котеровым et al. [356] обнаружен выраженный радиозащитный эффект Zn-МТ при введении мышам. Механизм противолучевого эффекта экзогенного ZnМТ *in vivo* остается не совсем ясным. Одной из главных причин его действия является, по-видимому, способность МТН путем инактивации свободных радикалов снижать последствия вызванного лучевым поражением оксидативного стресса.

L. Cai et al. [357], справедливо обращают внимание исследователей и практических врачей на возможность формирования устойчивости опухолевых клеток к применяемому в терапевтических целях радиационному воздействию, в том числе и за счет «протекторного» действия экспрессируемого в них МТН. По мнению вышеназванных авторов [357], МТН, в норме содержащийся в неповрежденных клетках, может защитить их от генотоксичности и цитотоксичности радиационного облучения. Эти эффекты модулируются также и другими клеточными факторами, помимо МТН, такими как антиоксиданты и регуляторы клеточного цикла, на его различных стадиях в процессе пролиферации, дифференциации клеток и апоптозе. Данные о защитной роли МТН для клеток тимуса мыши при вызванном облучением апоптозе подтверждены также другими авторами [358].

Значимость этих исследований для раскрытия механизмов защитного действия МТН не ограничивается радиационным фактором и вызываемым им оксидативным стрессом. Следует обратить внимание на различия в чувствительности подопытных животных к общему облучению в зависимости

от предварительного двукратного подкожного введения 50 мкмоль/кг $\text{Vi}(\text{NO}_3)_3$. Последующее гамма-облучение мышей приводило к гибели контрольных животных в течение 30 дней. Однако, летальный эффект у предварительно экспонированных висмутом мышей составлял 37,5 % по отношению к 100 % в контроле. Как видно из табл. 14, у экспонированных висмутом мышей активность антиоксидантных ферментов изменялась статистически недостоверно (в пределах 0-15 %), тогда как уровень МТН в клетках возрастал в два раза ($p < 0,05$).

Таблица 14

Влияние гамма-излучения и предварительного подкожного введения нитрата висмута (50 мкмоль/кг $\text{Vi}(\text{NO}_3)_3$) на активность антиоксидантов в клетках костного мозга мыши [359].

Антиоксиданты	Группы животных, n = 8	
	Контрольные	Экспонированные $\text{Vi}(\text{NO}_3)_3$
Г-S-T, нМ/мин/мг белка	58,24 ± 8,30	51,17 ± 21,31
СОД, ед./мг белка	0,40 ± 0,04	0,44 ± 0,04
Каталаза, мкМ/мин/мг белка	9,16 ± 1,88	10,00 ± 0,92
GSH-Px, нМ/мин/мг белка	57,06 ± 6,42	44,72 ± 6,02
GSH, М/мг белка	61,00 ± 5,20	72,44 ± 8,08
МТН, пмоль связанной Hg /мг белка	10,55 ± 1,43	19,54 ± 4,33

Авторы правомерно связывают повышение устойчивости мышей к гамма-облучению с индукцией синтеза МТН и его мРНК, что наглядно демонстрируют фореграммы мРНК МТН-1 в костном мозге и почках после подкожного введения нитрата висмута в дозе 100 мкмоль/кг, определяемой Норсерн-блоттинг методом (Northern Blot Analysis) (рис. 23)

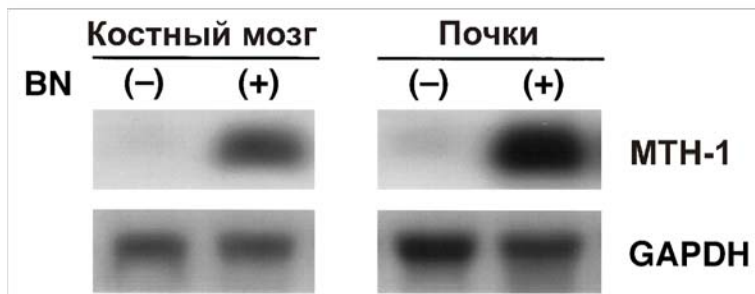


Рис. 23. Экспрессия мРНК МТН-1 в костном мозге и почках мышей после подкожного введения нитрата висмута в дозе 100 мкмоль/кг [359].

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

Известно, что оксидативный стресс может быть вызван тяжелым тепловым шоком при воздействии высоких температур. Регистрируемое при этом повышение синтеза МТН-1 может быть одним из важных компенсаторных механизмов в защите клеток после ожоговой травмы [360]. Qin F. с сотрудниками [361] доказали участие Zn-МТН в борьбе с окислительным стрессом у крыс с тяжелыми ожогами после отсроченной реанимации. У этих животных после моделирования пожара имело место развитие оксидативного стресса, зафиксировано нарушение проницаемости клеточных мембран вследствие повреждения мембранных белков АФК и другими продуктами термоокислительной деструкции, а предварительная индукция Zn-МТН снижала последствия действия недостатка кислорода и высоких температур.

Таким образом, основная сложность экспериментальных исследований по изучению антиоксидантных свойств МТН *in vivo* состоит в ограниченной возможности выделения количественного вклада этого низкомолекулярного белка в общий антиоксидантный ответ организма. Наиболее простым подходом является сравнение ответа АОС обычных и 0-МТН (нокаутных по МТН) мышей на одинаковое воздействие, приводящее к оксидативному стрессу.

В работе Y. Suzuki et al. [362] на культуре клеток астроцитов, полученных от обычных и трансгенных мышей, у которых отсутствует ген МТН (0-МТН мыши), показано, что при действии перекиси третбутила (стабильный источник свободных радикалов) в отсутствие МТН повреждение клеток значительно растет. В клетках 0-МТН мышей был существенно повышен уровень продуктов ПОЛ, что является убедительным свидетельством важной роли МТН в защите клетки от повреждающего действия свободных радикалов.

Данные о том, что МТН могут выступать как антиоксиданты, приведены также в работах [363, 364]. Zhou Z. et al. [365] показали защитную роль МТН при хроническом повреждении печени от алкоголизма.

Leila Khatai et al. [366] экспериментально доказали, что *in vitro* высвобождение цинка из МТН происходит также при

экспозиции оксидом азота NO. В поврежденных областях и МТН и индукция синтеза NO-синтазы вызываются одинаковыми факторами. При этом цинк, высвобожденный из МТН оксидом азота NO, подавляет и индукцию, и активность NO-синтазы. Для исследования этого процесса провели исследование по связыванию NO с глутатионом, у которого, так же как у МТН, имеются восстановленные SH-группы, которые связывают металлы. При взаимодействии NO и SH-групп происходит реакция S-аминирования, при которой металлсвязывающая способность SH-групп теряется. Однако авторы сами делают вывод, что в живой клетке концентрации восстановленного глутатиона многократно превышают концентрацию МТН, поэтому возможно механизм связывания NO и SH-групп металлотioneина не реализуется в живой клетке. Этот вопрос требует дальнейших исследований, однако это предположение имеет право на жизнь. В отличие от пероксинитрит-индуцированной активации гуанилил-циклазы, где глутатион необходим, делается вывод, что выделение металлов из МТН при помощи NO подавляется восстановленным глутатионом. Кроме того, показано, что цинк, основной металл в МТН млекопитающих в физиологических условиях и главный ингибитор NO-синтазы, легче высвобождается под влиянием NO, чем кадмия, но в отличие от МТН-1, количество Zn, высвобожденного из β -домена МТН-2, сопоставимо с таковыми для α -домена. Рассмотрение обмена Zn под действием оксида азота NO сделано в обзоре [367].

Способность МТН защищать от окислительного стресса сердечную мышцу показана в эксперименте *in vivo* [368, 369] на трансгенных мышцах с повышенной экспрессией МТН. При остром и хроническом окислительном стрессе (введение доксорубина, постишемическая реперфузия, обедненная медью диета) у трансгенных мышей с гиперэкспрессией МТН в сердце отмечена повышенная устойчивость к этим вредным факторам, по сравнению с обычными мышцами. Эта устойчивость проявлялась на биохимическом, морфологическом и функциональном уровнях. Защитное действие МТН коррелирует с его способностью к ингибированию АКФ, которые стимулируют ПОЛ. Тем не менее, некоторые аспекты

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

механизма антиоксидантного действия МТН *in vivo* требуют проведения дополнительных исследований [370]. Однако, использование новых молекулярно-генетических подходов и данных о строении цинк-тиолатных кластеров МТН существенно продвинули раскрытие указанного механизма.

Контроль МТН в регуляции окислительно-восстановительного статуса клеток предполагает участие ряда других регуляторных белков. Специальное исследование [371] было посвящено вопросу регуляции со стороны МТН функциональной активности ядерного транскрипционного фактора NF-κарра-В, который является одним из регуляторов окислительно-восстановительной функции факторов транскрипции в широком спектре физиологических и патологических реакций. Работа проведена с использованием генетически модифицированных мышей с отсутствующим геном синтеза МТН и обычных мышей. Впервые было показано, что МТН функционирует как отрицательный регулятор деятельности NF-κарра-В.

Наиболее вероятно, что этот вид регуляции осуществляется МТН по ведущему металлорегуляторному принципу. Как описано выше, в МТН существуют два тиолатных домена, которые способны связывать и высвобождать цинк, в зависимости от степени окисления лигандов серы. Так как S-нитрозилирование цистеина считают прототипом клеточного окислительно-восстановительного сигнализирующего механизма, исследовали реакции S-нитрозотиолов с различными изоформами МТН. В семействе металлотионеинов МТН-3 занимает особое место. Предполагают, что его основная роль состоит не в детоксикации ТМ и обеспечении гомеостаза цинка, а в защите клеток мозга от свободных радикалов. Оказалось, эти реакции с S-нитрозотиолами проходят с МТН-3 значительно активнее, чем с МТН-1 и МТН-2, тогда как реакционная способность всех трех изоформ по отношению к АФК сопоставима. Показано, что все три основные изоформы МТН являются одинаково эффективными в защите эмбриональных корковых нейронов крысы от перекиси водорода в первичной культуре, но МТН-3 проявляет наиболее резко выраженный защитный эффект против S-нитрозотиолов.

МТН-3 – единственная изоформа с согласованными кислот-но-основными последовательностями для S-нитрозотиолов в обоих доменах. Исследование с синтетическими и цинк-ресуспендированными доменами пептидов показывают, что S-нитрозотиолы действительно высвобождает цинк из альфа - и бета-доменов МТН-3. Показано, что МТН является биологически значимым в преобразовании NO сигналов в сигналы, связанные с изменением биодоступного (свободного) цинка уже на уровне пикомолярных концентраций. Особенно важна в этом смысле роль МТН-3, который содержится в мозге, обеспечивая его антиоксидантную защиту в комплексе с другими АОС [372].

Эти данные важны для понимания физиологических функций МТН-3. Его биологическая активность, как подавляющего рост нейронов фактора, представляет несомненный интерес не только для патологии человека, раскрытия патогенетических механизмов, лечения и диагностики болезней мозга, связанных с оксидативным или нитрозативным стрессом. Она одновременно важна для понимания возможности использования организмом одного и того же эффектора в разнонаправленных физиологических процессах, прежде всего, с позиций множественного характера регуляции протекторных функций [373].

Дискоординация регуляторного комплекса ведет к системным заболеваниям, при которых поражение функциональных систем обусловлено нейрогенной и гормональной дисфункцией. Это продемонстрировано, в частности, на экспериментальных моделях [374, 375] при изучении кардиомиопатий, вызываемых АКФ. У трансгенных мышей с врожденным диабетом (линия OVE26MT) и повышенной экспрессией МТН развивается кардиомиопатия, характеризующаяся, наряду с морфофункциональными изменениями, нарушением синтеза мРНК МТН, ишемическим состоянием со сниженной сократимостью миокарда. Миокард у животных с врожденным диабетом находился в состоянии окислительного стресса, что проявлялось в компенсаторном повышении и последующем подавлении синтеза МТН и G-SH, при одновременном нарастании уровня окисленного глутатиона.

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

Мыши с врожденным диабетом и повышенным кардиальным МТН (линия OVE26MT) были получены скрещиванием OVE26 трансгенных мышей (врожденный диабет) с трансгенными мышами, у которых была стойко повышена экспрессия МТН. Гипергликемия у OVE26MT мышей не отличалась от гипергликемии у OVE26 мышей. Несмотря на это у линии OVE26MT значительно меньше проявлялась кардиомиопатия. Как правило, в линии OVE26MT миокард оставался морфологически не измененным. Повышение уровня экспрессии МТН в миокарде предотвращало ослабленную ишемией миокарда сократимость, наблюдаемую у животных с диабетом.

Таким образом, гиперэкспрессия МТН в кардиомиоцитах, осуществление им антиоксидантных функций, уменьшает повреждение сердца при диабете. Похожие наблюдения описаны в работе [376], в которой дополнительно учитывались половые различия. Авторы [377] предложили использовать введение селена как профилактическое средство, вызывающее повышенную индукцию синтеза МТН, для профилактики кардиомиопатий, вызванных окислительным стрессом. При этом изучали индукцию синтеза МТН и уровень цинка в сердечной мышце, а также их влияние на морфологические и функциональные показатели. В работе [378] для этих же целей использовали превентивное ведение цинка. Результаты исследований в этой области предложено применять для людей, страдающих диабетом второго типа [379]. Способность к синтезу антиоксиданта МТН-1+2 была изучена у 13 обследованных (8 с диабетом 2 типа, 5 - контрольная группа) до и после 8 недель индукции синтеза МТН в скелетной мышце после физической нагрузки. Были взяты биопсии мышечной ткани и образцы крови. Иммуногистохимический анализ показал уменьшенные уровни МТН-1+2 в скелетной мышце больных с диабетом 2 типа по сравнению с контрольными субъектами. В контрольной группе произошло увеличение концентрации МТН-1+2 в ответ на индукцию, вызванную физическими упражнениями; однако, у больных с диабетом 2 типа уровни МТН-1+2 остались по существу неизменными. Значительно низшие уровни МТН-1+2 были так-

же обнаружены в плазме больных с диабетом 2 типа по сравнению с контрольной группой. Эти результаты показывают, что в контрольной группе система защиты МТН-1+2 активна и индуцибельна в ткани скелетных мышц и плазме. При диабете 2 типа низкая индукция МТ-1+II в мышцах и плазме, указывает на снижение антиокислительной защиты. Возможно, что нарушение синтеза МТН – один из патогенетических путей развития осложнений при диабете 2 типа [379].

Авторы [380] считают, что модуляция внутриклеточной концентрации тионеина (апоМТН) используется для координаруемого регулирования большого подмножества генов, транскрипция которых зависит от цинк-содержащих пальцевидных белков (*zinc finger proteins*).

Таким образом, анализ литературных данных за последние 30 лет позволяет сделать вывод, что металлотioneин не только осуществляет детоксикацию и участвует в поддержании гомеостаза металлов, но также играет важную роль в связывании свободных радикалов во время окислительно-повреждения.

Радикалы NO ($\text{NO}\cdot$) и супероксид-анион ($\text{O}_2\cdot^-$) играют важную роль в регуляции биологических функций и служат мессенджерами во многих регуляторных процессах. Таким образом, уже в нормальных физиологических условиях под влиянием разнообразных экзогенных и эндогенных стрессоров и патогенетических факторов при патологических процессах в ходе метаболизма образуются свободные радикалы, нарушающие окислительно-восстановительный гомеостаз клеток. При этом супероксид-анион порождает другие АФК, которые участвуют в индукции оксидативного стресса. Большинство клеточных регуляторных механизмов млекопитающих, в том числе МТН, служат для защиты клеток от оксидативного стресса и направлены на поддержание и восстановление окислительно-восстановительных гомеостаза.

Относительно большое число изоформ NAD(P)H оксидазы и NOS указывает на то, что природа в процессе эволюции ведет активный поиск путей и способов, чтобы использовать свободные радикалы, в процессах, непосредственно

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

не связанных с защитой от оксидативного стресса. Поэтому, в частности, образование супероксид-аниона, других АФК и NO строго регулируется гормонами, цитокинами, СОД, МТН и другими антиоксидантными системами. В то же время прооксидантные факторы в процессе эволюции начинают выполнять не связанные со стрессом функции. Они выступают в качестве вторичных мессенджеров для контроля различных физиологических реакций и процессов. Примером тому могут служить регуляция дыхательной вентиляции легких, сосудистого тонуса, релаксации гладких мышц, синтез эритропоэтина, а также расширение системы сигнальных каскадов, включающих различные рецепторы мембран и обеспечивающие практически все физиологические функции клеток. Благодаря своей уникальной структуре, высокому содержанию тиоловых групп и биодоступного цинка, металлотioneины играют важную (а иногда и ключевую) роль в защите клеток от оксидативного стресса и использовании ими динамичного окислительно-восстановительного потенциала для осуществления клетками физиологических функций.

Высокая эффективность МТН в процессах «гашения» АФК и функционирования клетки в условиях оксидативного стресса является свидетельством важной, а иногда ведущей роли МТН в процессах физиологической адаптации организма.

3.5. ТРАНСПОРТНАЯ ФУНКЦИЯ МТН И ЕГО УЧАСТИЕ В РЕГУЛЯЦИИ ГОМЕОСТАЗА ЦИНКА

Живые системы на всех уровнях организации обмениваются с окружающей средой веществом и энергией, т.е. с точки зрения термодинамики представляют собой открытые системы. Поэтому транспорт веществ через биологические мембраны - необходимое условие жизни. С переносом веществ через мембраны связаны процессы метаболизма, биоэнергетика, образование биопотенциалов, генерация нервного импульса и др. Нарушение транспорта веществ через биомембраны приводит к различным видам патологии

[381].

Одной из основных функций белков является транспорт органических и неорганических соединений. Для некоторых из них эта функция является ведущей. Транспортные белки обеспечивают поступление в клетку веществ, необходимых для ее нормального функционирования и одновременно способствуют проникновению токсичных элементов и соединений. Транспортные функции белков включают в себя транспорт соединений во внеклеточной среде, обеспечение проникновения через клеточную мембрану внутрь клетки и выведение из клетки продуктов метаболизма. К транспортным белкам относят также порообразующие белки клеточных мембран (пороны), обеспечивающие активный транспорт через клеточные мембраны.

В последние десятилетия механизм транспорта d-металлов в биосистемах уделяется большое внимание. Так, в работе [382] рассмотрены механизмы транспорта железа, меди, марганца и цинка из внеклеточной среды у *Saccharomyces cerevisiae*. Ионы металлов должны транспортироваться во внутриклеточные органеллы, где они функционируют как каталитические и структурные кофакторы для компарментализованных ферментов. Синтез белков-транспортеров регулируется на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях, что ограничивает избыточное накопление, а также обеспечивает хранение и секвестрацию ТМ.

Как правило, для обеспечения транспорта ТМ существует несколько взаимодополняющих механизмов, которые участвуют в транспорте металлов через клеточные мембраны. Они включаются в зависимости от концентрации металла в клетке. Поскольку ТМ находятся в организме, и особенно цитоплазме клеток, преимущественно в связанном с белками и низкомолекулярными органическими соединениями виде, трудно оценить градиент их электрохимический активности при пересечении плазматической мембраны. Поэтому, предположение, о том, что трансмембранный перенос ТМ всегда сопровождается расходом энергии, должно делаться с осторожностью. Факт супрессии процесса транспорта ТМ

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

метаболическими ингибиторами и характер его температурной зависимости еще не являются достаточным основанием для суждения об энергетической составляющей, которая не всегда требует расхода энергии.

Поддержание гомеостаза обеспечивается определенными специфическими механизмами применительно к доставке в клетку эссенциальных металлов. Они же участвуют, вероятно, в поступлении в клетку токсичных элементов [383], поскольку не было выявлено селективных механизмов для транспорта последних. Накопление любого отдельного иона металла обеспечивается не менее чем двумя субстратспецифическими транспортными системами, как это недавно было показано в исследованиях на дрожжевых клетках [384] для ряда металлов. Высокоспецифичные транспортные системы включаются в клетках при недостатке металла, тогда как более универсальные работают прежде всего при избытке субстрата. Такого рода наблюдения описаны [385] при изучении механизма регулирования транспорта железа в *eukaryote Saccharomyces cerevisiae*. У этих дрожжей существуют две различные железо-транспортные системы, включающиеся в метаболизм в зависимости от бионакопления металла. В железо-насыщенных средах для накопления железа используется транспортная система низкого сродства (константа Михаэлиса $K_m = 30$ мкмоль/л). Эта система может также использоваться для транспорта других металлов, в т.ч. кобальта и кадмия. При недостатке железа в клетке включается транспортная система с высоким сродством к металлу (константа Михаэлиса $K_m = 0,15$ мкмоль/л). Редуктазы FRE1 и FRE2 на клеточной поверхности обеспечивают восстановление железа для обеих систем. АТФ-независимый мембранный транспортер (FET4) признан основным для низкоселективного транспорта железа.

Клеточный транспорт и участие в гомеостазе Fe в физиологических условиях тесно связаны с биообменом клеточного Zn. Примером такого взаимодействия является их совместное присутствие в металлофосфатазе кальцийнейрине [386], которая играет важную роль в антиоксидантной защите клеток путем активации СОД1. Дефицит Zn ведет к

нарушению димерной структуры СОД, стабильность которой поддерживается в нормальных условиях кальцийнейрином.

Идентичные механизмы обеспечивают транспорт и внутриклеточный метаболизм железа в норме и патологии. В частности, болезнь Альцгеймера часто осложняется накоплением внутриклеточного Fe^{2+} и внеклеточного Fe^{2+} в амилоидных бляшках. Было обнаружено также [387], что предшественник β -амилоидного белка APP обладает феррооксидазными свойствами. Его активность усиливается ферритином и ингибируется Zn^{2+} . Подобно церулоплазмину, APP каталитически окисляет Fe^{2+} , поставляет Fe^{3+} трансферрину и взаимодействует с ферропортином в клетках НЕК293Т, нокаутных по церулоплазмину. Подобные функции он выполняет в интактных тканях коры головного мозга человека. Удаление APP в НЕК293Т клетках и первичных нейронах приводит к накоплению Fe^{2+} , то время как увеличение содержания APP695 способствует выведению железа из клеток.

В отличие от нормальных мышей, APP (-/-) мыши обладают повышенной чувствительностью к высокому содержанию железа в продуктах питания, что приводит к накоплению Fe^{2+} и развитию окислительного стресса в корковых нейронах. При этом освобождение металлотионеином эндогенного Zn^{2+} ведет к ингибированию феррооксидазной активности APP, что является убедительным примером не только взаимодействия железа и цинка в клеточном метаболизме, но и роли МТН, который является донором биодоступного цинка в клетке и одновременно антистрессорным белком. Нарушение обмена цинка в перегруженных этим ионом патологических амилоидных бляшках связывает этот вид патологии также с накоплением железа в нейронах при болезни Альцгеймера.

Поскольку процесс транспорта металлов в клетку у прокариот и эукариот является многокомпонентным, как по числу участвующих в нем белков, так и биоэлементов, можно высказать гипотезу, что в его осуществлении МТН принадлежит важная роль. Это корреспондируется, в первую очередь, с транспортом и регуляцией взаимосвязанного с

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

метаболизмом железа гомеостаза цинка [388, 389]. Именно в этом плане большой интерес представляют металлотионеины, для которых металлотранспортная функция является одной из ведущих [390]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что МТН в первую очередь выполняют редокс-зависимые функции в метаболизме цинка, а не цинк-зависимые функции в окислительно-восстановительном обмене веществ [391].

Роль цинка в организме человека трудно переоценить, для лечения многих патологических состояний соединения цинка интуитивно применяют с древнейших времен. Со времен Парацельса до наших дней в фармакопее значится 0,25%-ный раствор сульфата цинка в качестве глазных капель. Как присыпка издавна применяется цинковая соль стеариновой кислоты. Фенилсульфат цинка – хороший антисептик. Суспензия, в которую входят инсулин, протамин и хлорид цинка – эффективное средство против диабета, действующее лучше, чем просто инсулин. И вместе с тем многие соединения цинка, прежде всего его сульфат и хлорид, токсичны.

Биологическая роль цинка выяснена не до конца. Еще в 1869 г. было показано, что цинк является необходимым элементом питания гриба *Aspergillus niger*. Цинк обнаружен во всех клетках и органах высших животных и человека. Общее содержание цинка в теле человека весом 70 кг составляет 2–3 г. Суточная потребность в цинке 12–20 мг. Среднее содержание в крови составляет 600–800 мкг% (0,6–0,8 мг на 100 мл). Наибольшее его количество обнаруживается в сетчатке глаза, предстательной железе и сперме, печени и мышцах, т.е. в тканях, характеризующихся высокой метаболической активностью. Находящийся в клетках цинк легко соединяется с аминокислотами, белками, пуриновыми основаниями, нуклеиновыми кислотами [392], играет важную роль в метаболизме РНК и ДНК, в функционировании Т-клеточного звена иммунитета, в метаболизме липидов и белков. Он входит в состав многих металлоферментов (сейчас их известно более 300). Его важная роль в активном центре содержащегося в эритроцитах фермента карбоангидразы была

установлена еще на инициальных этапах развития неорганической биохимии. Карбоангидраза ускоряет выделение углекислого газа в легких. Кроме того, она помогает превратить часть CO_2 в ион HCO_3^- , играющий важную роль в обмене веществ. Цинк необходим для функционирования многих дегидрогеназ, например, глутаматдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, а также алкогольдегидрогеназы, содержащейся в печени и катализирующей окисление этанола в уксусный альдегид. Цинкзависимыми являются такие жизненно важные гормоны, как инсулин, кортикотропин, соматотропин, гонадотропины. Zn способен корректировать адаптационные механизмы при гипоксических состояниях, увеличивать емкостные и транспортные способности гемоглобина по отношению к кислороду. Наряду с противooksидлительным действием цинк уменьшает неспецифическую проницаемость мембран клеток, являясь их протектором, и участвует в предотвращении фиброза. Считают, что цинк обладает антиоксидантными свойствами, а также улучшает действие других антиоксидантов.

Дефицит цинка влияет на репродуктивную функцию. В 2010 году исследователи из Северо-Западного университета (Northwestern University) под руководством Т. Woodruff установили, что из-за дефицита цинка нарушается овогенез — процесс деления и созревания предшественниц яйцеклеток (овоцитов), при котором количество хромосом уменьшается вдвое (мейоз). У цинк-дефицитных овоцитов асимметричность деления наблюдается в 75% случаев [393].

При недостатке цинка деление яйцеклетки (мейоз) прекращается на телофазе I (последняя стадия первого деления) и не переходит к метафазе II (второе деление). В цинк-дефицитных клетках хромосомы находятся на полюсах, но в неконденсированном состоянии (не плотно упакованные, как полагается при делении), а форма веретена деления нарушается. Как указывает Т. Woodruff, наиболее интенсивное поглощение цинка овоцитом происходит в последние два часа созревания. На этой фазе яйцеклетка поглощает около двух миллиардов ионов цинка. Процесс поступления и выведения цинка из генеративных клеток происходит дискретно,

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

в виде импульсов, что связано с накоплением его в цитоплазматических эндосомах и последующем экзоцитозом. Такого рода импульсы регулируются путем изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция. Проведенные исследования обращают внимание на роль цинка в процессе овогенеза. До момента созревания яйцеклетки высокое содержание внутриклеточного цинка приводит к блокированию вхождения еще незрелой яйцеклетки в митотический цикл. После оплодотворения яйцеклетка элиминирует избыток цинка, что позволяет начать процесс деления зиготы и ее имплантацию. Поскольку источником свободного цинка в яйцеклетке является Zn-МТН, именно ему принадлежит сигнальная роль в оценке степени созревания яйцеклетки и процесса овуляции. Эта функция МТН координируется за счет его взаимодействия с интрацеллюлярным кальцием.

Цинк-зависимые белки, включаемые в репарацию ДНК и в контроль клеточного цикла, могут представлять чувствительные мишени для токсичных металлов, таких как Cd (II), Ni (II), Co (II) и Cu (II), так же как для некоторых соединений селена. Вытеснение цинка другими переходными металлами, а также окислительно-восстановительные реакции, ведущие к обмену тиол/дисульфид, могут играть роль в реализации токсического действия такого рода соединений ТМ. В их осуществлении МТН принадлежит важная роль [394].

С цинком в организме тесно взаимосвязан другой важный микроэлемент — селен. Он также регулирует репродуктивную функцию. Обычно при недостаточном синтезе половых гормонов в организме имеется дефицит как цинка, так и селена, однако неясно, что в этом случае первично. Дефицит МТН при недостаточном содержании цинка в питании задерживает рост костей [395], способствует возникновению дерматозов [396], а небольшой избыток цинка позволяет бороться с ожоговыми травмами [361].

Сегодня активно изучается сигнальная и регуляторная роль цинка в пролиферации и дифференциации клеток млекопитающих [397].

За последние десятилетия появилось большое количе-

ство работ, авторы которых ставят своей целью раскрытие механизмов транспорта цинка и регулирования его метаболизма. Это, в частности, позволило существенно расширить наши представления об участниках транспортировки цинка в биосистемах, так в работе Gaither L.A., Eide D.J. [398] показано, что в транспорте цинка важную роль играют два семейства транспортеров, ZIP (Zrt-, Irt-like Protein) и CDF (Cation Diffusion Facilitator). Члены каждого семейства вовлечены в транспорт ионов металлов, в т.ч. цинка, через бислойные липидные мембраны. Практически все транспортеры цинка кодируются сходными генами у организмов, стоящих на разных уровнях эволюционного развития. Такая универсальность позволяет предположить, что другие, пока еще неохарактеризованные члены вышеуказанных семейств, также участвуют в ионном транспорте металлов. Многие транспортные белки из семейства ZIP-транспортеров включаются в клеточный обмен цинка. Так транспортер Zrt3 в *S. cerevisiae*, транспортирует цинк во внутриклеточную область в процессе адаптации к дефициту цинка. Напротив, члены семейства CDF обеспечивают выход цинка из клетки или способствуют транспортировке цинка во внутриклеточные компартменты для хранения, детоксикации и/или выведения. Несмотря на участие узконаправленных специфичных систем в поддержании клеточного гомеостаза цинка, регуляторные функции остаются как правило, за МТН.

Santon A. et al. [399] изучали *in vitro* взаимодействие МТН и эссенциальных металлов на культуре клеток гепатомы Н4-II-E-C3 и фибробластов обычных (МТН +/+) и мутантных (МТН -/-) крыс с целью оценки клеточной адаптации к действию ТМ ($ZnSO_4$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $CuSO_4+ZnSO_4$ или $ZnSO_4+FeSO_4$) в концентрациях, превышающих физиологический уровень. Накопление исследованных металлов разными клетками существенно различалось и изменялось в зависимости от сочетания взаимодействующих металлов. Так, воздействие Zn^{2+} существенно снижает накопление Fe^{2+} , а по мере индукции МТН цинком растет внутриклеточное накопление Cu^{2+} . Одновременное накопление в клетках гепатомы МТН и GSH свидетельствует об их взаимодействии

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

при осуществлении защитных и регуляторных функций по отношению к ТМ. Авторы приходят к заключению, что влияние цинка на клеточные уровни меди и железа координируется МТН и GSH.

Эти же механизмы могут участвовать во взаимосвязанном транспорте металлов через клеточные мембраны, а также проявлении ими физиологических функций. В то же время, способность ТМ проходить через клеточные мембраны во многом определяет их поглощение, распределение в организме и выделение, а также их токсическое действие.

Не подвергая сомнению биологическую и физиологическую значимость транспортной функции МТН и ее роли в жизнедеятельности клеток и организма в целом, следует еще раз подчеркнуть важность и других выполняемых этим белком и поставляемым им цинком функций

В частности, N.Z. Cvijanovich et al. [400] высказали гипотезу, что изменение содержания цинка в плазме крови представляет ключевой элемент в патогенезе воспалительных заболеваний у детей, что коррелируется со сдвигами в экспрессии МТН. В частности, снижение концентрации цинка в крови до 0,26-0,66 мг/л имеет место только у детей с выраженными признаками воспалительных заболеваний. Причем даже после трехдневной интенсивной терапии у них сохранялись низкие значения цинка, которые были однонаправлены с гипоальбуминемией, а также позитивно коррелировали с экспрессией МТН-1А ($p < 0,01$), МТН-1G ($p = 0,02$), и МТН-1Н ($p = 0,03$). В то же время содержание меди в сыворотке крови оставалось на исходном уровне. Последнее указывает на осуществление МТН регуляторной функции почти исключительно по отношению к гомеостазу цинка. Отмечена обратная взаимосвязь между содержанием цинка в плазме крови в процессе лечения и такими маркерами воспаления, как С-реактивный белок, интерлейкин-6, начиная с 4 дня лечения. Последнее коррелирует с данными об экспрессии МТН в процессе воспаления именно в эти же сроки. Авторы указывают на необходимость управления содержанием цинка в плазме крови, т.к. этот показатель выс-

тупает критическим фактором при воспалительных заболеваниях у детей. Вероятным инструментом управления и одновременно оценочным маркером процесса воспаления могут быть МТН-1 и МТН-2, как наиболее универсальные его изоформы.

Накапливается все больше информации о выполнении цинком взаимосвязанной с МТН сигнальной функции на всех уровнях трансдукции сигнала. Цинк может модулировать обнаружение, распознавание сигнала, включение вторичного метаболизма мессенджеров за счет изменения активности киназ и фосфатаз. Цинк может ингибировать активность факторов транскрипции, зависимость которых от цинка показана на экспериментальных моделях. Цинк способен специфично модифицировать метаболизм cGMP, активности протеинкиназы С и митогенактивирующей протеинкиназы, транскрипционного фактора МТФ-1, который контролирует транскрипцию генов МТН и транспортера ZnT-1. В заключение обоснована новая гипотеза о регуляторной роли ионов цинка на путях процессов сигнализации в клетке [401].

МТН выступает как инструмент регуляции уровня цинка в клетке и транслокации его в ядро на этапах клеточного деления и дифференциации клеток. Именно этот взаимосвязанный с МТН механизм обеспечивает исключительную роль цинка как необходимого участника многокомпонентного процесса пролиферации и дифференциации клеток, необходимого в первую очередь для регуляции синтеза ДНК и клеточного митоза. Как справедливо указывают Beyersmann D., Haase H. [402], эта функция цинка на молекулярном уровне реализуется путем его включения в структуру большого количества белков, в т.ч. обладающих каталитическими свойствами. В последних цинк может осуществлять роль сигнализатора для изменения направления клеточного метаболизма. Одновременно цинк выступает как фактор транскрипции, взаимодействуя с такими регуляторными белками, как МТФ-1, NF-карра-В и др. Гомеостаз цинка в клетках эукариотов контролируется на этапах поступления в клетку, интрацеллюлярного накопления в специальных везикулах «цинкосомах», распределения между ядром и цитоплазмой и элиминации.

Таким образом, к настоящему времени накоплено достаточно информации о важной роли цинка в клеточном гомеостазе, осуществлении им каталитических функций в составе большого количества ферментов, участии в процессах детоксикации и других защитных функциях организма. Большая часть этих функций контролируется и регулируется на клеточном уровне с участием МТН, экспрессия которого зависит от потребности клеточных систем в цинке и способствует поддержанию его гомеостаза.

3.6. РЕГУЛЯТОРНАЯ И СИГНАЛЬНАЯ ФУНКЦИИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНА

МТН был открыт как белок, осуществляющий металл-транспортную функцию. Защитная роль МТН при интоксикации кадмием и ртутью, а также участие МТН в транспорте меди и цинка доказаны достаточно давно, но непрекращающиеся исследования позволяют выявить все новые «функциональные обязанности» этого белка. Активно изучается и получает все новые подтверждения важная роль МТН в защите клетки от окислительного стресса, в том числе и путем модулирования окислительно-восстановительных сигналов [403]. Однако имеющиеся в литературе данные об индукции МТН различными по своей природе и физиологической роли факторами, позволяют предположить, что в условиях нормальной жизнедеятельности организмов, стоящих на различных ступенях эволюционной лестницы, его значение не может ограничиваться указанными, преимущественно патогенетическими, процессами интермедиарного обмена. Подобно другим биоактивным низкомолекулярным белкам, полипептидам и др. соединениям (глутатион, мини-РНК, белки типа Р53 и др.), МТН должен выполнять и другие физиологические функции.

Известно, что МТН модулирует связывание, обмен и транспорт ТМ, таких как Zn, Cu, Cd в физиологических условиях, а также осуществляет цитопротекцию от их токсического действия. В частности, он регулирует выход (образование) медиаторов, таких как гидроксильные радикалы или

оксид азота. Показано также, что МТН влияет на значительное количество клеточных процессов, таких как экспрессия генов, апоптоз, пролиферация, дифференциация. Хотя мыши с отсутствующим геном синтеза МТН вполне жизнеспособны, что ставит под сомнение критические функции МТН для теплокровных в физиологических условиях, эта молекула может занимать ключевое положение при чрезвычайных ситуациях во взаимоотношениях клетка-ткань-органы, например, при стрессе. Не случайно, уровень МТН существенно повышается при разных видах стресса [404].

Большинство авторов связывают основную регуляторную роль МТН с его способностью «дозированно» выделять ионы цинка в зависимости от окружающих условий. Как было указано в предыдущем разделе, Zn – эссенциальный металл, необходимый для роста, дифференциации и выживания клеток. Его недостаток нарушает устойчивость, иммунные свойства и создает другие проблемы для здоровья. Поэтому гомеостаз Zn контролируется уже на уровне одной клетки. Zn, как известно, важен для иммунной системы, однако механизмы этого процесса неизучены. Zn известен также как нейротрансмиттер. Кроме того, Zn связывается с некоторыми сигнальными молекулами, такими, например, как протеинтирозиновые фосфатазы (*PTPs*) и влияет на их активность. Однако остается неизвестным, является ли цинк сам по себе интрацеллюлярным сигнализатором, ведь он обладает в клетке совершенно другими видами действия, чем экстрацеллюлярный Zn. Авторы [405] предлагают концепцию, в соответствии с которой Zn действует как сигнализатор, и рассматривают, как минимум, две сигнальные функции: поздняя сигнализация – экспрессия транспортеров Zn, и ранняя сигнализация – «волны Zn» и прямо индуцируемая ими экстрацеллюлярная стимуляция. Обобщаются также новые данные о роли Zn в функционировании иммунной системы.

Динамичная доступность клеточного Zn является регуляторным фактором в протекании иммунных процессов. Он может играть, как про- так и противовоспалительную роль, которая зависит от прямого взаимодействия Zn с секрецией цитокинов моноцитами. Naase H. [406] рассматривает моле-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

кулярные основы взаимодействия цинка с сигнальной трансдукцией моноцитов. Им показано, в частности, что Zn может активировать или ингибировать некоторые сигнальные пути, которые взаимодействуют с сигнальной трансдукцией рецепторов, так называемые «*Toll-like receptors*» (TLR). Они сенсбилизируют молекулярные структуры, дериваты патогенов, и, вследствие активации, ведут к секреции провоспалительных цитокинов. Взаимодействие Zn с протеинтирозинфосфатазой и протеинкиназой C, а также прямая модуляция липополисахарида, соединяющего их рецептором с TLR-4, являются результатом повышенной продукции цитокина. С другой стороны, комплексное взаимодействие между Zn, NO и сигнальным циклическим нуклеотдом, и ингибирование рецептора IL-1, ассоциированного с киназой-1 и ингибитором каппа-B-киназы, ведет к продукции провоспалительных цитокинов. Авторами обсуждается роль MTH, как цинксвязывающего протеина, в регуляции действия всех этих сигнальных молекул внутриклеточной сигнализации Zn. При действии всех этих сигнальных молекул статус Zn в моноцитах может оказывать прямое воздействие на воспаление.

Наиболее естественно предположить наличие у MTH регуляторных функций, которые он реализует в процессе поддержания гомеостаза цинка. Исследование [407] демонстрирует опосредованную системой апоMTH/MTH активацию или ингибирование различных цинксодержащих металлоферментов и факторов транскрипции и объясняет потенциальную роль MTH в реакциях передачи металла на молекулы рецептора. Обеспечение наиболее типичных апопротеинов цинком при синтезе металлопротеинов лимитируется не только транспортом цинка с помощью MTH в различные компартменты клетки, но и другими транспортерами, в частности из семейства ZIP. Наличие динамической взаимосвязи апоMTH/MTH позволяет данному белку дозировано обмениваться с «потребителями» цинка в местах их синтеза. Это, в частности, определяет различное содержание цинка в клетках на разных стадиях их роста, развития и дифференцировки в условиях эмбриогенеза и постнатального развития.

Таким образом, участие MTH в гомеостазе цинка оп-

ределяет его важную регуляторную роль в процессах клеточного метаболизма. В последние два десятилетия в литературе появилось много подтверждающих это положение данных, основанных на экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*, а также клинко-физиологических материалах [408].

Изучение передачи цинка от МТН к обедненной цинком сорбитол-дегидрогеназе (EC 1.1.1.14) *in vitro* было использовано для исследования роли МТН в обмене цинка в клетке [409]. Для насыщения цинком сорбитол-дегидрогеназы требуется молярное соотношение 1:1 МТН к сорбитол-дегидрогеназе, что позволяет утверждать, что переносится только один из семи атомов цинка в МТН в этом процессе. Восстановленный глутатион (GSH) и глутатиондисульфид (GSSG) (окисленный глутатион) выступают как критические модуляторы не только скорости передачи цинка, но и количества атомов цинка, участвующих в обмене. GSSG увеличивает скорость передачи цинка в 3 раза, и его концентрация — главный регулятор для эффективного переноса цинка. GSH имеет двойную функцию. В отсутствие GSSG он ингибирует передачу цинка из МТН, который находится в латентном состоянии при относительно высоких концентрациях GSH в клетке. Кроме того, реакция МТН с GSSG увеличивает скорость передачи цинка в 10 раз и увеличивает число перемещенных цинковых атомов в четыре раза. Эксперименты с меченым ⁶⁵Zn подтверждают отщепление одного иона цинка от МТН в отсутствие глутатиона и более эффективную передачу - при наличии активированной системы GSH/GSSG. Вероятно, в условиях *in vivo*, МТН регулирует величину пула биодоступного цинка в клетке. Этот процесс динамически контролируется взаимодействием МТН с GSH/GSSG. Эти результаты свидетельствуют, что изменение окислительно-восстановительного статуса клетки может служить движущей силой и сигналом для отщепления цинка от МТН. Подобные данные содержатся в работе J.C. Barbato et al. [410], в которой рассматривается взаимодействие МТН и восстановленного глутатиона при регулировании цинкового и окислительно-восстановительного гомеостаза клеток и подтверждает-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

ся их тесное взаимодействие в процессах клеточного метаболизма. Не случайно, уровень МТН существенно повышается при разных видах стресса. Поэтому, поскольку синтез МТН индуцируется при воспалении, можно говорить о его роли при воспалительных заболеваниях разных органов и тканей [404].

Ряд работ указывает на регуляторную роль МТН в энергетическом обмене, осуществляемую путем взаимодействия с АТФ. Так, L.-J.Jiang, W. Maret, B. L. Vallee [411] установили, что АТФ связывается с МТН-2 млекопитающих. Взаимодействие между АТФ и МТН приводит к конформационным изменениям белка, что подтверждено методом спектроскопии ЯМР [412]. ³⁵С ЯМР-спектроскопия доказала участие хлорид-аниона в комплексообразовании в качестве дополнительного лиганда МТН, который может участвовать во взаимодействии АТФ с МТН. ¹Н ЯМР/ТОСЫ спектры демонстрируют, что связывание с АТФ затрагивает N- и C-концевые аминокислоты молекулы МТН.

Участие МТН в энергетическом обмене частично объясняет развитие умеренного ожирения у 0-МТН-мышей и роль МТН в регулировании энергетического баланса. Это взаимодействие предполагает механизм для клеточной транслокации, задержания и реакционной способности комплекса АТФ-МТН в митохондриальном межмембранном пространстве. Это обеспечивает участие системы МТН/аптоионеин в митохондриальном дыхании за счет последовательных циклов связывания и освобождения цинка.

Применительно к ряду ТМ, не принимающих участия в нормальном метаболизме клеток, МТН осуществляет функцию «узнавания», сигнализируя таким образом о необходимости запуска процесса их связывания и элиминации. Наиболее четко эта функция МТН прослеживается в клетках эпителия проксимальных канальцев почек. Комплекс МТН с токсичным металлом избирательно поступает в указанные клетки, взаимодействует с рецепторами мембран лизосом, инициируя процесс активации первичных и образования вторичных лизосом, а также регулируя активность содержащих-

ся в них многочисленных ферментов. Интересно отметить, что подобную роль МТН выполняет в эпителиальных клетках дыхательных путей, кишечника, где происходят процессы первичного связывания и выведения ТМ. Эта функция МТН несводима к процессам транспорта ионов металлов. Она может быть охарактеризована как сигнальная либо инициирующая применительно к включению либо активации сложного многоэтапного механизма удаления ТМ из организма.

Вероятная сигнальная функция МТН в физиологических условиях может быть прослежена также на примере его взаимосвязи с апоптозом клеток. Последний, как известно, индуцируется не только в патологических условиях, но и закономерно обеспечивает процесс ликвидации клеток, завершивших свой жизненный цикл либо накопивших значительное число дефектных фрагментов ДНК или синтезированных белков. Как известно, МТН тесно взаимосвязан с экспрессией белка р53, являющегося супрессором апоптоза. Повышенная продукция апоМТН в молодых клетках сменяется ингибированием этого процесса в процессе старения. Это может явиться сигналом для супрессии р53 на посттранскрипционной стадии, что в свою очередь, ведет к усилению апоптоза клеток. Применительно к иммунокомпетентным клеткам этому могут способствовать реципрокные (антагонистические) взаимоотношения МТН с интерлейкинами. Этот аспект проблемы апоптоза как физиологического процесса, с одной стороны, и роли его многочисленных участников, с другой, требует дальнейших исследований.

Поскольку теория старения активно разрабатывается в последние годы именно во взаимосвязи с геномикой, протеомикой и иммуномикой, понятие физиологической сущности и биологической значимости процессов клеточной смерти требует глубокого переосмысления. Рост продолжительности жизни в развитых странах ставит вопрос не только о продлении жизни пожилых людей, но и о пролонгирования возраста активной деятельности с сохраненным физическим и душевным здоровьем. Следует понимать, что старение – закономерный биологический процесс с количественными спонтанными биохимическими и физиологическими измене-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

ниями и ростом чувствительности к заболеваниям. Некоторые алиментарные факторы (Zn, Se, ниацин) могут ремоделировать эти изменения, приводя к снижению или хотя бы отсрочке патологических сдвигов [413]. Следствием этого является «здоровое старение», с поддержанием иммунных функций, метаболического гомеостаза и антиоксидантной защиты. Эксперименты *in vivo* (старые и молодые мыши, низкое потребление Zn) и *in vitro* (лимфоциты человека, экспонированные эндотоксином) показали, что Zn является важным элементом для иммунной эффективности (как врожденной, так и адаптивной), метаболического гомеостаза (использование энергии и обмен гормонов) и антиоксидантной активности (фермент АОС супероксиддисмутазы - СОД). Ниацин опосредованно обеспечивает стабильность генома, являясь прекурсором NAD⁺, субстратом для активности фермента PARP-1, участвующего в репарации ДНК. Se инициирует освобождение Zn из МТН путем регуляции деятельности глутатион-пероксидазы (ГП). Этот факт является важным для пожилых людей, поскольку уровень МТН не может обеспечивать достаточную концентрацию доступного Zn в клетке, необходимого, в частности, для иммунной эффективности, метаболической гармонии и антиоксидантной активности. Принимая во внимание существование транспортеров Zn (ZnT и семейство ZIP-транспортеров), обеспечивающих вход и выход Zn из клетки, важно понять их взаимодействие с МТН при старении. Все три упомянутых процесса нуждаются в наличии достаточного количества Zn, который обеспечивает долгожительство и выживание родившихся, молодых и старых тимусэктомированных мышей.

Внутриклеточный гомеостаз цинка регулируется путем окислительно-восстановительного статуса тиоловых групп. Авторы [414] рассматривают цинковый статус у пожилых и возможность его регуляции путем алиментарного поступления цинка, а также с генетических позиций оценивают роль в нем МТН и провоспалительных цитокинов, таких как IL-6, т.к. последний включается в экспрессию генов МТН и интрацеллюлярный гомеостаз Zn.

Взаимодействие Zn с генами играет ведущую роль в

повреждении некоторых релевантных цитокинов (IL-6 и TNF- α) и белков теплового шока (HSP70-2) при старении. Сейчас изучаются [415] наиболее частые зависимые от возраста болезни, такие как атеросклероз, инфекции, а также условия, необходимые для «благополучного старения» (*nonagenarians*). Полиморфизм генов, кодирующих провоспалительные белки, является ответственными за продолжительность жизни. С другой стороны, провоспалительные белки ассоциированы с атеросклерозом или тяжелыми инфекциями. Продолжительность жизни во многом детерминирована генетически, однако, зависит также и от алиментарных факторов. Взаимодействие генетического полиморфизма с врожденным иммунным ответом, биодоступность иона цинка и гомеостаз МТН являются инструментом, который играет важную роль в своевременном обеспечении клетки цинком, особенно при невозможности МТН отдавать и освобождать цинк при хроническом воспалении и старении. Этот последний факт при старении ведет к депрессии врожденного иммунного ответа для защиты хозяина. Напротив, в старческом возрасте воспаление менее выражено и, следовательно, Zn имеет большую биологическую значимость при меньшей экспрессии генов МТН и удовлетворительной иммунноэффективности. Поэтому взаимодействие МТН с IL-6, TNF- α , Hsp70-2 через гомеостаз Zn необходимо для нормального протекания процесса старения организма.

Таким образом, приведенные данные и высказанные предположения о полифункциональной роли МТН в физиологии клеток и организма в целом, сделанные на основе анализа весьма противоречивой информации в многочисленных публикациях и материалах собственных исследований, должны рассматриваться как попытка первичного обобщения и поиска направлений по дальнейшему изучению физиологических функций МТН.

3.7. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МТН

Многочисленные разнообразные свойства МТН закономерно вытекают из его строения, поэтому изучению струк-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

туры апобелка и закономерностей связывания металлов с ним в последние годы уделяется повышенное внимание. Современные методы исследования МТН могут быть условно разделены на два больших класса:

1. физико-химические методы анализа структуры
2. методы количественного определения содержания МТН в биобъектах

3.7.1. Физико-химические методы анализа структуры

О большинстве методов исследования структуры мы говорили в начале главы. К ним относятся методы одномерной и двумерной гомо- (^1H , ^{13}C , ^{35}Cl) и гетероядерной спектроскопии ЯМР, которые позволяют измерить расстояния между стерически сближенными фрагментами молекулы белка, которые находятся на значительном расстоянии в первичной структуре, а с помощью применения ионов редкоземельных элементов, которые выступают парамагнитными зондами, изучено образование координационных связей между ионами металлов и остатками цистеина и измерены длины связей [416].

Рентгеноструктурная абсорбционная спектроскопия дала детальную информацию о координации связываемых элементов (кадмий, медь, цинк), рентгеноструктурный анализ и методы масс-спектрометрии в комбинации с высокоэффективной жидкостной хроматографией позволили описать образование двух доменов и рассчитать количество связанных в каждом из них ионов металлов (рис. 24). Электрофоретическими методами было доказано наличие «смешанных» форм МТН с разными металлами, а методы химической модификации доказали присутствие в тканях в нормальных физиологических условиях также апотионеина и окисленного тионина, которые не содержат металлы.

Методы изучения структуры МТН развиваются особенно стремительно в последние десятилетия, что связано с появившейся возможностью препаративного выделения в достаточном количестве очищенного МТН, т.к. методы изучения структуры требуют достаточно большого количества

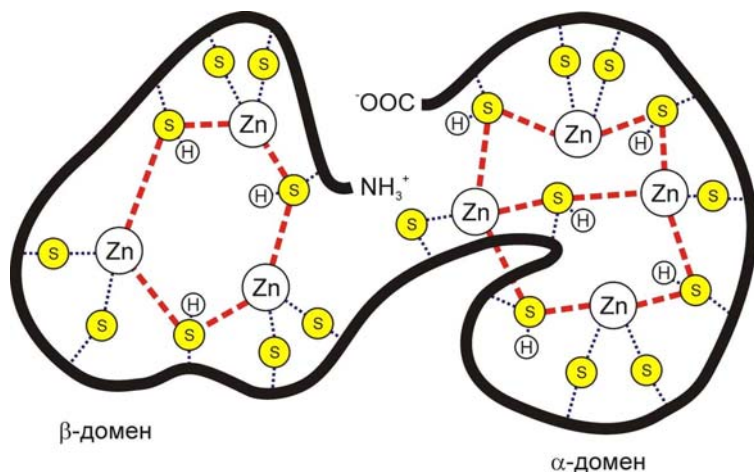


Рис. 24. Схематическое изображение строения Zn-тиолатных кластеров МТН с указанием остатков цистеина. Основано на данных дифракции рентгеновских лучей и ЯМР-спектроскопии [417]. Жирным пунктиром показаны донорно-акцепторные координационные связи между SH-группами цистеина и цинком, тонким пунктиром – ковалентные σ -связи.

чистого белка.

Кроме того, следует упомянуть успешно развивающиеся микрометоды в биохимии этого белка [418].

3.7.2. Современные методы количественного определения металлотионеинов

В связи с важной ролью МТН в диагностике различных патологий, задача количественного определения его в крови, органах и тканях животных и растений является весьма актуальной. Пик развития методов определения МТН в разных биосубстратах пришелся на середину 80-х годов прошлого века, когда были заложены принципиальные основы основных методов.

В литературе описано несколько способов определения содержания металлотионеинов в биологических объектах [419, 420]. Они основаны на специфических свойствах этого класса белков. Уместно в данном контексте повторить, что металлотионеины – это низкомолекулярные белки, кото-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

рые в организме всегда стехиометрически связаны с ионами металлов [421]. Металлотионеины не содержат в своём составе ароматических аминокислот, но содержат до 30 % цистеиновых аминокислотных остатков, содержащих SH-связи. С учетом этих особенностей, первые химические методики измерения концентрации металлотионеинов базировались на определении количества связанных ионов металлов (ртуть, кадмий) или на определении количества тиоловых групп в образце. Группа методов, основанная на полном замещении эссенциальных металлов в МТН другим металлом с более прочным и быстрым связыванием в условиях *in vitro* (обычно, кадмием или ртутью) с последующим удалением избытка несвязанного металла и количественным высокоточным определением связанного, получила название «заместительных» методов.

На рис. 25 представлена принципиальная схема методики определения МТН модифицированным нами методом [422].

Ход определения

Приготовление проб. При определении металлотионеинов в тканях необходимо приготовить гомогенат из расчета 100 мг влажной ткани на 1 мл бидистиллированной воды. Для анализа берётся 1 мл гомогената и разбавляется 2 мл бидистиллированной воды.

При анализе плазмы крови 1 мл плазмы разводят 2 мл бидистиллированной воды.

При анализе гепаринизированной крови или эритроцитарной массы 1 мл образца разводят 2 мл бидистиллированной воды для прохождения гемолиза.

Осаждение высокомолекулярных белков. Полученную пробу перенести в центрифужные пробирки и добавить 0,3 мл 30 %-ной ТХУ для полного осаждения высокомолекулярных белков. Центрифугировать 15 минут при 3000 об./мин. Слить центрифугат в чистые центрифужные пробирки. Он содержит низкомолекулярные белки, часть из которых способна связывать кадмий и относится нами к металлотионеинам.



Рис. 25. Принципиальная схема количественного определения содержания металлотионеина в биосредах методом насыщения.

Замещение металлов в металлотионеинах кадмием. В полученный центрифугат внести 0,2 мл раствора Cd^{+2} с концентрацией 100 мкг/мл. Избыток кадмия необходим для того, чтобы ионов Cd^{+2} заведомо хватило для полного замещения

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

цинка и меди в металлотионеинах. Пробу необходимо выдерживать 10 минут для полного прохождения реакции.

Металлотионеины обладают высоким сродством к кадмию. *In vitro* кадмий вытесняет из металлотионеинов цинк и медь, которые связаны с ними *in vivo*. Методами спектроскопии ЯМР [167, 423] установлено, что кадмий связывается с металлотионеинами в стехиометрических количествах (7 атомов на 1 моль белка). Т.о., точно определив содержание кадмия, которое связалось с металлотионеинами, можно рассчитать содержание металлотионеинов. Поскольку кадмий связывается также с высокомолекулярными белками, необходимо предварительно освободить от них анализируемую пробу. Это можно сделать несколькими способами:

- провести ультрацентрифугирование при 105 000 g при охлаждении до 4°C;
- обработать пробу ацетоном;
- обработать CH_3CN до конечной концентрации 50 %;
- обработать пробу кислотой;
- провести термокоагуляцию.

Во всех случаях осаждённые белки удаляются центрифугированием. Первый способ позволяет фракционно осадить белки, но сопряжён с техническими трудностями и требует наличия специального оборудования, что делает его недоступным для большинства клинических лабораторий. Второй и третий предусматривают введение в систему большого количества органических растворителей, что затрудняет дальнейший ход анализа.

Наиболее оптимальным для определения металлотионеинов является четвертый способ. В кислой среде происходит осаждение высокомолекулярных белков, а низкомолекулярные, к которым относятся и металлотионеины, остаются в растворе. В качестве кислоты выбрана традиционно используемая трихлоруксусная кислота (ТХУ). Нами установлено, что 0,3 мл 30 %-ной ТХУ на 3 мл пробы достаточно для полного осаждения высокомолекулярных белков.

Удаление избыточного кадмия. Затем из полученной системы необходимо удалить избыток Cd^{2+} . Для этого ис-

пользуют разные методы. Наиболее часто используют осаждение кадмия гемоглобином, который связывает свободный кадмий, находящийся в растворе (т.н. гемоглобиновый метод). Мы модифицировали методику, заменив осаждение кадмия гемоглобином соосаждением с карбонатом кальция. Известно, что при соосаждении удаётся практически полностью осадить следовые количества ионов металлов [424]. В пробу при перемешивании нужно внести 0,5 мл 1 М раствора CaCl_2 и 1,0 мл 1 М раствора Na_2CO_3 . Пробу центрифугировать 20 минут при 8000 об./мин.

Разложение органических веществ. Надосадочная жидкость содержит связанные с кадмием металлотиионеины и различные низкомолекулярные органические соединения. Надосадочную жидкость необходимо слить в тefлоновый стаканчик и поместить на 2 часа в автоклав (150° С, среда — конц. HNO_3) для разложения органических веществ.

Определение содержания кадмия. В полученной пробе необходимо определить содержание кадмия, которое, как уже было отмечено, пропорционально содержанию металлотиионеинов. Наиболее часто используемый радиологический способ определения требует специализированной оснащённости лаборатории и предусматривает наличие радиоактивных изотопов. Правда, достоинством этого метода является отсутствие необходимости удаления органических веществ (стадии автоклавирования).

Нами использовались атомно-абсорбционный либо атомно-эмиссионный методы, которые являются достаточно чувствительными и не требуют применения радиоактивных веществ.

Пробу после автоклавирования необходимо количественно перенести в мерную колбу на 25 мл. Довести объём получившегося раствора до метки бидистиллированной водой и напрямую определить в нём концентрацию Cd^{2+} .

Концентрация металлотиионеинов в исходном образце рассчитывается по формулам (1) для гомогената ткани и (2) для образцов крови, плазмы, эритроцитарной массы:

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

$$C_{MT} = \frac{250 \cdot c_{Cd^{2+}}}{7 \cdot 112} = 318,9 \cdot C_{Cd^{2+}}, \text{ (нмоль/г)}, \quad (1)$$

$$C_{MT} = \frac{25 \cdot 1000 \cdot c_{Cd^{2+}}}{7 \cdot 112} = 31,89 \cdot C_{Cd^{2+}}, \text{ (нмоль/л)}, \quad (2)$$

где 250 и 25 – разбавление пробы для гомогената ткани и (2) для образцов крови, плазмы, эритроцитарной массы (1);

112 г/моль – молярная масса Cd ;

1000 – коэффициент приведения мкмоль/л в нмоль/л;

7 – стехиометрическое соотношение Cd²⁺/металлотионеин;

C_{Cd²⁺} - концентрация Cd²⁺ в анализируемой пробе, мкг/л.

С помощью нашего метода исследовано содержание металлотионеинов в различных биологических объектах (крови, эритроцитарной массе, плазме крови, гомогенатах человеческой плаценты, почек и печени крыс). Полученные нашим методом результаты сопоставимы с результатами, полученными гемоглобиновым методом. При модификации нам удалось без потери чувствительности и усложнения методики заменить достаточно дорогой реактив (гемоглобин) более дешевыми неорганическими солями (карбонатом натрия и хлоридом кальция) и сложный в исполнении радиологический метод — более простым атомно-абсорбционным.

Вообще следует понимать, что выбор метода измерения концентрации металлов на последнем этапе методики определяется только его чувствительностью к иону-заместителю (мкг/л, мкг/кг) и наличием в лаборатории специального оборудования.

Так с появлением в нашей лаборатории высокочувствительного современного прибора ЭМАС-200 CCD, работающего на принципе АЭС-ДА, мы модифицировали концовку методики, изменив пробоподготовку и последнюю стадию.

При использовании на последней стадии метода АЭС с электродуговой атомизацией пробы необходимо перевес-

ти анализируемую пробу в твердое порошкообразное состояние. Этого можно добиться двумя разными способами, каждый из которых имеет свои преимущества. В первом случае после удаления избытка кадмия надосадочную жидкость подвергают «сухому озолению» в муфельной печи в присутствии небольшого количества специальной буферной смеси (KCl + графитовый порошок), поддерживающей постоянную температуру дуги.

Во втором случае после удаления избытка кадмия надосадочную жидкость подвергают «мокрому озолению» с последующим соосаждением карбонатом кальция, который в этом случае кроме коллектора при соосаждении играет также роль спектрального буфера.

Усредненные результаты измерения содержания МТн в печени животных опытной (после предварительной индукции) и контрольной групп представлены в табл. 15.

Из анализа таблицы можно сделать вывод, что предварительное (за 24 ч до выведения из эксперимента) введение ацетата цинка в дозе 50,0 мг/кг вызывает индукцию синтеза МТн (в среднем, трехкратный рост концентрации МТн в печени по сравнению с интактными животными), что достоверно подтверждается при использовании методов атомно-абсорбционной и атомно-эмиссионной спектроскопии. В зависимости от имеющегося оборудования для измерения концентрации МТн может быть использован любой из этих методов. Полученные данные сопоставимы с данными, приведенными в статье [425], в которой содержание МТн опре-

Таблица 15
Содержание МТн в печени крыс (нмоль/г) при определении разными методами

№ животного	Содержание МТн, нмоль/г печени			
	Контроль		Опыт	
	ААС-ДА	АЭС-ЭТА	ААС-ДА	АЭС-ЭТА
1	2,37	2,41	11,31	10,94
2	3,12	3,02	8,75	9,12
3	5,11	4,74	14,33	14,27
4	2,73	2,9	9,29	9,52
5	3,14	2,73	7,25	7,41
Среднее	3,29	3,16	10,19	10,25
Станд. отклонение	1,06	0,91	2,74	2,57
Довер. интервал	0,93	0,80	2,40	2,26

Примечание: Различия между опытом и контролем достоверны при обоих методах определения

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

деляли подобным методом по насыщению ртутью. У контрольных животных содержание МТн в печени составляло 25 нмоль связанной Hg на 1 г ткани, что соответствует около 3,6 нмоль МТн/г ткани печени, а после индукции неорганической солью марганца в концентрации 600 мкмоль/кг, составляла 140 нмоль связанной Hg на 1 г ткани, что соответствует около 20 нмоль МТн/г ткани печени. Однако существует мнение [420], что метод с насыщением ртутью дает более высокие значения, чем другие методы, в том числе и метод насыщения кадмием.

Метод «насыщения» требует высокой квалификации специалистов-аналитиков и достаточно трудоемок, но по аппаратурному оформлению он доступен большинству лабораторий, осуществляющих анализы биосубстратов человека на содержание токсичных тяжелых металлов. В то же время следует понимать, что эта группа методов дает «интегральное» содержание всех форм МТН и не позволяет определять отдельно изоформы МТН-1 и МТН-2. Обычно для целей выявления причин металлопатий и металлотоксикозов этой информации бывает достаточно.

Таким образом, наиболее широко распространены методы определения концентрации МТН, которые основаны на вытеснении металлов из МТН и полного замещения их кадмием, с последующим определением его концентрации разными методами. Один из таких способов представлен в работе [426]: высокомолекулярные белки денатурируются с ацетонитрилом (50%-ая конечная концентрация), медь, связанная с МТН удаляется избытком тетратиомолибдата аммония, и его комплексы с медью удаляются с DEAE-Sephacel. Апотиионин насыщается Cd, затем избыток Cd связывается Chelex 100. Пробирный анализ с использованием тиомолибдата имеет предел обнаружения МТН 14 нг на пробу и таким образом особенно применим для измерения МТН при малых количествах ткани (например, биопсии) и в культуре клеток. Кроме того, комбинация пробирного анализа с применением тиомолибдата с недавно разработанным Cd-Chelex пробирным анализом также позволяет определить часть МТН, который связывает медь, при условии, что количество не-Cu-

тионеина превышает 100 нанограммов (предел чувствительности пробирного анализа Cd-Chelex).

Сравнение методов насыщения кадмием и радиоиммуноанализа (RIA) проведено в работе [427]. Пробирный анализ насыщения кадмием является более доступным по аппаратному оформлению, но считается менее специфичным и точным, чем RIA. Авторы модифицировали методику анализа МТН в моче и плазме для измерения концентрации МТН в тканях. Для печени и почек контрольных крыс получены значения 7 и 67 мкг/г, соответственно. Предел чувствительности пробирного анализа - 10 нг/г. Т.о. модифицированная версия пробирного анализа способом насыщения кадмием дает результаты, которые сопоставимы с полученными методом RIA.

В это же время был разработан флуориметрический метод ELISA для обнаружения и количественной оценки МТН. Данные радиоиммуноанализа (RIA) и флуориметрического метода ELISA дают расхождение 5-10 % [428].

Чувствительность радиоиммуноанализа (RIA) в ткани - 10 нг МТН/г ткани. Пробирный анализ насыщения кадмием, по мнению авторов [429], является неподходящим для измерения низких уровней МТН вследствие его неспецифичной природы и невысокой чувствительности (10 мкг МТН/г ткани), но полезен, когда в ткани присутствуют большие количества белка. Уровни МТН в мозгу, почке, печени, легком, мышце, поджелудочной железе, тонкой кишке, и селезенке крыс, определенные методом радиоиммуноанализа (RIA), оказываются ниже, чем принятые в настоящее время значения, измеренные другими методами.

Работа [430] представляет собой обзор методов количественного определения МТ и изучения полиморфизма с 1995 года. Описаны методы разделения, электрохимические методы, иммунологические методы и методы количественного анализа мРНК МТН. Представленные данные основаны на собственных результатах и литературных данных. Представлен краткий обзор использования металлотioneина как биомаркера и важности количественного анализа МТН.

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

Новый метод определения содержания МТН в печени и почках крыс с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографией (HPLC) с предварительной колоночной гель-фильтрацией на Superdex 75 описан в работе [431]. Ткань гомогенизировали и центрифугировали, в супернатант предварительно вводили избыток кадмия и нагревали перед HPLC определением. МТН за короткое время полностью отделялся от других тканевых белков крыс, и был количественно определен непосредственно как функция поглощения УФ-света при 250 нм. Восстановление МТН для печени и почек крыс превышало 90 %. Коэффициент вариации был 1,3 % для МТН печени крысы и 1,7 % для МТН почки крысы. Предел чувствительности был 0,265 мкг для МТН печени и 0,095 мкг для МТН почки крысы. Существующий метод был сравнен с традиционным методом насыщения кадмием для измерения МТН в печени и почках крысы. Была найдена хорошая корреляция для этих двух методов.

Электрохимическое определение МТН широко используется в экологических исследованиях. Определение базируется на комплексообразовании цисплатина и МТН с последующим восстановлением комплексов на электроде. Для достижения самой высокой чувствительности и разрешающей способности была проведена оптимизация экспериментальных параметров с использованием увеличения реакционной поверхности. Были оптимизированы семь химических и физических параметров, а именно, pH, концентрация цисплатина, концентрация буфера, потенциал выделения, квадратная частота волны, амплитуда импульса и шаг электрического потенциала, и составили: pH 9,0; концентрация цисплатина 5,9 мкмоль/л, концентрация буфера 0,65 моль/л, потенциал выделения – 0,2 мВ, квадратная частота волны 229 Гц, амплитуда импульса 46 мВ и шаг электрического потенциала 2 мВ. Предел чувствительности 0,1 мкг/л [432].

Был разработан быстрый метод анализа МТН в пищевых продуктах при помощи капиллярного зонного электрофореза (CZE). Метод позволяет отдельно определять два изомера МТН (МТН-1, МТН-2) в пищевых продуктах за 10 минут с использованием фосфорнокислой буферной систе-

мы, состоящей из 0,02 моль/л Na_2HPO_4 и 0,02 моль/л NaH_2PO_4 (рН 7,0), и УФ-обнаружения при 200 нм. При оптимальных экспериментальных условиях, минимальный предел обнаружения был 1 мг/л. Относительные допустимые отклонения были ниже 10 % [433].

Метод обнаружения МТН по методике Western blotting описан в работе [434]. Гомогенаты тканей крыс, содержащие Cd-МТН-1, были подвергнуты гель-электрофорезу в натрий додецилсульфат/полиакриламидном геле (SDS-PAGE) без предварительного восстановления 2-монотиогликолем (2-ME), потому что предшествующее восстановление МТН с помощью 2-монотиогликоля приводило к появлению диффузных областей. После SDS-PAGE МТН был восстановлен из геля вымачиванием в буфере, содержащем 2-монотиогликоль, и затем электрофоретически перемещен в мембрану поливинилиденфторида. Невосстановленный МТН не был иммобилизован на мембране. До электрофореза цинк в образцах МТН должен быть замещен кадмием путем введения хлорида кадмия. МТН, иммобилизованный на мембране, был обнаружен двумя методами, (1) связыванием радиоактивного кадмия и (2) иммунохимическим окрашиванием, пределы чувствительности которых были 0,4 и 0,06-0,16 мкг в пробе, соответственно.

В работе [435] описано определение концентрации МТН капиллярной электрофорез-масс-спектрометрией (CE-MS –метод).

Точности и чувствительности методов определения МТН препятствуют высокие фоновые уровни, низкая специфичность доступных в настоящее время реактивов, сложность и многостадийность процесса. Для преодоления этих трудностей разработана методика определения содержания МТН с использованием конкурентной твердофазной процедуры (DELFA). Метод основан на усилении иммунофлуоресценции при диссоциации долгоживущего лантанидного комплекса с обнаружением моноклональных антител Анти-МТН, связанного с твердой фазой МТН. Эта проба позволяет в режиме реального времени проводить обнаружение связыва-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

ющего антитела, основанное на связывании и обмене лантанида между различными хелатами. Этот процесс сопровождается флуоресценцией и сопровождается увеличением чувствительности. Метод позволяет измерить низкие уровни МТН, которые не выявляются с использованием методик поточного радиоиммуноанализа (RIA) и твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), и дает воспроизводимые результаты с низким фоном в широких пределах концентраций МТН [436].

Новый комбинированный аналитический метод предложен для определения и исследования тиоловых белков [437]. Он основывается на хроматографии с обратной фазой (reverse phase chromatography RPC), соединенной с атомно-флуоресцентной спектрометрией холодного пара (cold vapour generation atomic fluorescence spectrometry CVGAFS). Перед хроматографией белки одновременно денатурируют и перекомплексовывают в фосфорнокислом буферном растворе, содержащем 8,0 моль/л пара-гидроксимеркурибензоата (p-hydroxymercurybenzoate PHMB). Белки, в которых металлы заменены ртутью, отделяют на колонке C4 Vydac Reverse Phase. Затем выходящую из колонки фракцию белков денатурируют бромом, произведенным *in situ* в реакционной среде по реакции $KBr/KBrO_3 + HCl$. Это позволяет быстро конвертировать и несвязанный PHMB и PHMB, связанный с белками в неорганическую ртуть, при наличии метанола в RPC фазе растворителя. Ртуть (II) селективно обнаруживается борогидридным методом. При оптимизированных условиях обработка бромом дает 98 ± 2 % восстановления и свободного и связанного с белком пара-гидроксимеркурибензоата. Было изучено влияние метанола на чувствительность обнаружения ртути (II). RPC-CVGAFS система применялась для анализа МТН в печени кролика и в титрованных растворах их коммерческих изоформ МТН-1 и МТН-2. Анализ денатурированных PHMB-МТН комплексов позволил определить количество тиоловых групп, связанных с PHMB. Было найдено, что МТН печени кролика имеют $10,0 \pm 0,3$ (МТН-1) и $6,7 \pm 0,3$ (МТН-2) -SH групп, способных к комплексообразованию с PHMB. Предел чувствительности для PHMB

в 95%-ом метаноле в оптимизированных условиях был приблизительно $9,3 \times 10^{-9}$ моль/л и для денатурированных МТН был приблизительно $8,6 \times 10^{-10}$ моль/л, с учетом приблизительного отношения РНМВ:МТс 7:1.

Разделение изоформ МТН с использованием капиллярного электрофореза может быть улучшено путем модификации поверхности капилляров, при которой металлсвязанный МТН выходит позже в спектрах масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ICP-SFMS). 9 комплексов МТН в коммерческом препарате из печени кролика были успешно разделены на анионной полимер-связанной колонке, приготовленной иммобилизацией poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid) на поверхности кварцевого стекла при помощи связывающего агента. В необработанных капиллярах или капиллярах покрытых катионным материалом выделялись только три комплекса. Комбинация проточного изотопного анализа комбинированного с CE/ICPSFMS позволяет установить стехиометрическое соотношение металлов в комплексах с МТН [438].

О развитии чувствительного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) для МТН-1 человека сообщают группы исследователей Akintola D.F. и Milnerowicz H. [439, 440]. МТН был выделен из печени трупа человека и использовался для иммунизации кроликов. Проба была специфична для МТН-1 человека, и не было никакой значительной перекрестной реакции с МТН-2 человека. Предел чувствительности определения был 5 нг/мл, что позволяло определять МТН-1 в плазме и моче. Нормальный референтный уровень для МТН-1 был 32 ± 16 нг/мл в плазме и 10 ± 6 нг/мкмоль креатинина в случайных выборках мочи. Не были найдены сколько-нибудь существенные различия между величинами для мужчин и женщин.

Чувствительный метод обнаружения МТН с использованием окрашивания серебром и ауторадиографии после электрофореза в полиакриломидном геле в присутствии додецилсульфата натрия описан в статье [441]. Предварительно необходимо провести карбоксиметилирование МТН, потому что оно предотвращает агрегацию, таким образом

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

разрешая каждой изоформе МТН появиться в виде отдельного пика. МТН может быть обнаружен с пределом уровней нг/пик. Этот метод может быть применен к МТН, индуцируемым *in vitro* в культивируемых клетках и *in vivo* в тканях.

Попытки совместить хроматографию с ААС предприняты авторами [442]. МТН были отделены на трех видах HPLC колонок, которые отличаются по принципу разделения: гель-фильтрующая хроматография (по размеру), ионный обмен (по заряду) и полностью обращенная фаза (*reversed phase*). Элюация колонок нейтральным и слабо-основным буферным раствором предотвращала отщепление металлов. Металлы, связанные с МТН, элюировались количественно. Металлы в экстракте из адсорбента непрерывно определялись на атомном абсорбционном спектрофотометре. При этом элюат непосредственно вводился в трубку распылителя.

Недавние эксперименты в применении радиоиммунного анализа (RIA) для обнаружения и количественной оценки МТН в сыворотке и моче человека показывают, что возможно снизить нижний предел количественной оценки с предыдущего предела 50-100 пг до 1 пг. Радиоиммунный анализ нормальной сыворотки показывает, что типичный диапазон концентраций МТН - от 0,01 нг/мл до 1 нг/мл, и что концентрации выше 2 нг/мл нужно считать патологическими. Типичный диапазон для нормальной мочи - от 1 нг/мл до 10 нг/мл; концентрации выше 10 нг/мл нужно считать патологическими. Дополнительно метод сравнивали с твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA). Существующий диапазон для количественной оценки МТН методом ELISA приблизительно 50-50000 пг (флуориметрическая концовка) или 500-5000 пг (колориметрическая концовка). Недавно с использованием радиоиммунного анализа идентифицировали основные антигенные детерминанты МТН позвоночных и человека [443].

Экспрессная, воспроизводимая и чувствительная ионообменная хроматография, объединенная с ААС с электротермической атомизацией в графитовой печи, применялась для разделения и количественного определения количества обоих основных изоформ МТН в печени рыб (*Limanda limanda*). Цитозоль печени инкубировали с избытком Cd, очищали

двухступенчатым осаждением ацетоном до хроматографического анализа. Изоформы МТН были отделены селективной ионообменной хроматографией и были впоследствии определены количественно косвенно ААС в графитовой печи через содержание в них Cd. Было оптимизировано количество Cd, необходимого для насыщения. Эффективность насыщения Cd и осаждения ацетоном была доказана гель-проникающей хроматографией (GPC) и анализом распределения металла. Определялось 98 % МТН после ацетонового осаждения и 68 % после селективной ионообменной хроматографии. Расчетный предел чувствительности для этого метода - 2 нг МТН/мг белка [444].

Использование комбинированных техник анализа, основанных на последовательном использовании высокоэффективной жидкостной хроматографии и зонного электрофореза с ICP-ES (электро-аэрозоль-масс-спектрометрия) или ICP-MS (масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой), позволило обнаружить две главных изоформы металлотioneина (МТН-1 и МТН-2) в печени и одну изоформу МТН в почках. Фактическое число пиков в хроматограммах и электроферограммах было большим из-за формирования смешанных Cd-Cu комплексов одинаковых изоформ МТН, которые по-разному гидрофобизованы и имеют разную массу [445].

Таким образом, суммируя вышесказанное, следует отметить, что в последние годы существует тенденция к приближению методик количественного определения содержания МТН к нуждам практического здравоохранения и экологии за счет разработки более экспрессных и менее трудоемких методик. Широкому внедрению методик определения МТН для диагностики металлопатий препятствует высокая стоимость анализа, отсутствие отечественных антител к МТН для иммуноферментного анализа, низкая аппаратная оснащенность большинства лабораторий. В то же время, предложенный нами более сложный и трудоемкий метод, безусловно, неприемлем для больших объемов анализов, но он достаточно дешев и может быть использован для дополнительного подтверждения металлопатий в любой лаборато-

РАЗДЕЛ 3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ – МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (БИОХИМИЯ, ИММУНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ)

рии, оснащенной для анализа биосубстратов на ТМ при условии наличия квалифицированного химика-аналитика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в настоящем разделе данные характеризуют МТН как семейство низкомолекулярных богатых цистеином термостабильных белков, определяемых практически во всех живых организмах микробного, грибкового, растительного и животного происхождения, что свидетельствует об их важной биологической роли в процессах жизнедеятельности.

Благодаря особенностям строения и высокому содержанию биологически активных тиоловых групп, МТН обладает исключительной способностью к связыванию ионов цинка и меди в физиологически значимых соотношениях. При этом можно предположить преимущественную структурообразующую роль меди в молекуле МТН и функциональную, динамичную, индуцибельную - применительно к цинку.

Способность обменивать ионы цинка на эквивалентное число ионов других одно- и двухвалентных металлов, хотя и является практически изначально доказанной, тем не менее, остается недостаточно изученной в плане возможной дифференцированной роли частично и полностью замещенных форм МТН. Это же относится к перечню поливалентных физиологических функций рассматриваемого семейства МТН. Если их участие в процессах транспорта ионов металлов, поддержании гомеостаза цинка и участия в процессах детоксикации не вызывает сомнения, то относительно базисных функций имеющих в литературе данных совершенно недостаточно. Вероятно, преодоление имеющихся трудностей в развитии данного направления может быть основано на углублении наших представлений о структурно-функциональных связях, дальнейшему раскрытию особенностей функционирования различных представителей и в разной степени активных форм МТН, изучения взаимосвязи апоМТН и МТН, а также более четкого определения совокупного участия и вклада отдельных биологически активных участников

фундаментальных процессов роста, развития, биотрансформации и смерти различных видов клеток и клеточных систем. Важная роль в развитии данного направления принадлежит разработке новых методов исследования МТН, поскольку к настоящему времени возможности мониторинга физиологических процессов с помощью методов, основанных на определении ионов металлов, практически себя исчерпали. Они сохраняют несомненное значение для широкого круга общепатологических и клинических исследований. Однако работы по изысканию и внедрению новых методов относятся к числу наиболее актуальных в решении проблемы физиологии МТН.

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

За прошедшие 50 лет интенсивных исследований накоплен большой объем информации, освещающей данные клинических и экспериментальных работ, которые посвящены детальному изучению роли МТН в патологии. Существенно расширен перечень индукторов экспрессии генов, мРНК, синтеза МТН при различных видах заболеваний, исследованы вероятные механизмы вовлечения этого класса белков в патогенез соответствующих видов нарушений клеточного гомеостаза. И хотя большинство авторов признает наличие позитивной роли МТН, вытекающей из его участия в гомеостазе эссенциальных металлов, в купировании проявлений оксидативного стресса, связывания и элиминации из организма токсичных металлов, а также вовлечения его в процессы супрессии апоптоза и канцерогенеза, многие аспекты проблемы, касающиеся клинической значимости и диагностической ценности МТН, возможности и целесообразности применения его в терапевтических целях, остаются неоднозначными и недостаточно изученными.

Кроме того, в опубликованных статьях и обзорах рассматриваются в основном лишь конкретные случаи либо отдельные виды патологии без достаточно полного и всестороннего обобщения накопленной информации. Вероятно, это связано со сложностью и многоаспектностью проблемы,

неизбежной в таких случаях разноплановостью и фрагментарностью публикуемых данных, а также появлением в последние годы результатов исследований и наблюдений, не вписывающихся в традиционную схему позитивной «защитной» концепции ролевых функций МТН. Интерпретация этих данных весьма осторожна и гипотетична. Однако она позволяет поставить вопрос о вероятных негативных эффектах повышенной индукции синтеза МТН при некоторых видах патологии, например, при канцерогенезе, сопровождающихся повышением устойчивости трансформированных клеток к химиотерапевтическим средствам. Эти позиции также требуют дальнейшего изучения.

Необходимы этапные обобщения накопленной информации для определения путей и направлений дальнейших исследований, привлечения внимания широкого круга исследователей к остающейся по-прежнему актуальной проблеме биологии, физиологии и патологии металлопротеинов. Попытка такого рода этапного обобщения клинико-экспериментальных данных предпринята в настоящем разделе. Представленный материал также страдает фрагментарностью. Он может рассматриваться скорее как введение в проблему изучения роли МТН в различных видах патологии.

4.1. РОЛЬ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ДЕТОКСИКАЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Открытие МТН в 1957 г. было связано с изучением токсического действия кадмия, который к этому времени вышел на одно из ведущих мест не только как промышленный, но и экологический токсикант. Вскоре многочисленными исследованиями была показана довольно специализированная и четко прослеживаемая роль МТН, с одной стороны, в поддержании клеточного гомеостаза эссенциальных металлов, и транспортно-детоксикационная функция по отношению к токсичным металлам, с другой.

Из-за высокого сродства к белкам и многим другим органическим молекулам, МТН в свободной или несвязанной форме в биологических системах практически не существуют. Поэтому исследование свойств и поведения свободных

металлов в модельных условиях *in vitro* не всегда дают адекватную информацию, которую можно было бы перенести непосредственно на поведение металлов в опытах *in vivo*.

Сложные взаимоотношения с биосистемами у ТМ складываются уже на этапе поступления в клетку. Мембранный транспорт неэссенциальных токсичных ТМ (тяжелые металлы типа D по классификации [43]) не только контролирует их доступ к внутриклеточным сайтам основных клеток-мишеней, но и позволяет проследить их накопление, распределение и выведение из организма. Решающая роль мембран в токсикологии металлов класса D привлекает внимание многих исследователей. Благодаря этому была собрана обширная информация о механизмах переноса металлов через мембраны. Характеристики транспорта металлов в различные клетки, или даже на противоположных сайтах одной клетки в различных физиологических условиях не идентичны. Они существенно усложняются при разного рода патологических состояниях.

Среди возможных механизмов рассматриваются такие как диффузия, активный транспорт, роль ионных каналов, эндоцитоз и др. Кроме того, в последнее десятилетие внимание исследователей привлекли к себе внимание также ионная и молекулярная мимикрия в процессах транспорта [446, 447]. Все эти возможности широко обсуждаются в литературе, так как поступление ТМ в клетку признается ключевой стадией в запуске патологического процесса и патогенезе металлотоксикозов и металлопатий.

Поскольку для объяснения механизмов, лежащих в основе наблюдаемых фактов относительно быстрого проникновения токсикантов данного класса в клетку унитарная теория оказалась не пригодной, была сформулирована плюриполярная гипотеза транспорта токсичных металлов через клеточные мембраны, пригодная практически для всех клеток [43].

В механизмах транспорта через клеточную мембрану и реализации токсического действия тяжелыми металлами, как неоднократно подчеркивалось выше, существенная роль

принадлежит МТН. Особенности его влияния на токсикокинетику и токсикодинамику развивающихся с участием металлов патологических процессов наиболее четко прослеживаются на примере кадмия и ртути. Именно у этих металлов имеется наиболее высокая аффинность к МТН, а также наблюдается взаимосвязь с уровнем синтеза этого белка, его комплексов с Zn и Cu, в процессах клеточного транспорта, проявлениях токсичности и механизмах детоксикации.

4.1.1. Кадмий

Особый интерес к кадмию вызван его нахождением в Периодической системе элементов в триаде цинк-кадмий-ртуть, что свидетельствует о близости его химических свойств к таковым у цинка, который, как показано в предыдущих разделах, необходим для нормальной жизнедеятельности организма и является ключевым компонентом металлизированного МТН. В то же время по токсичности Cd во многом близок к ртути, что нашло отражение в общих подходах к диагностике, лечению, профилактике отравлений и металлопатий, вызванных этими глобальными экотоксикантами.

Кадмий (Cd) входит в число металлов IIB группы, с атомным весом 112,41 г/моль, существует в двух формах в зависимости от степени окисления (0 или +2). Он присутствует в земной коре и, как правило, окружающей среде, в виде оксидов и неорганических солей (таких как оксид кадмия (CdO), хлорид кадмия (CdCl₂), или сульфат кадмия (CdSO₄) [448]. По оценкам специалистов, ежегодно в окружающую среду из антропогенных источников поступает около 25000-30000 т Cd. Причем, большой вклад в этот показатель (от 4000 до 13000 т в год), вносят добыча и сжигание ископаемого топлива [449]. Самым крупным источником воздействия Cd на население является сигаретный дым: каждая сигарета может содержать от 1 до 2 мкг Cd, и 40-60% этого количества со вдыхаемым дымом обычно проходит через легочный эпителий в системный кровоток. В связи с высоким содержанием Cd в табаке, его ретенция в организме курильщика увеличивается в 1,5-2 раза, по сравнению с некурящими.

Среди некурящих основным источником Cd являются потребляемые в пищу продукты [450].

Как и многие другие ТМ, кадмий обладает выраженными кумулятивными свойствами и имеет отчетливую тенденцию к накоплению в организме [451]. Период его полувыведения составляет 10-35 лет. К 50-летнему возрасту человека общее содержание кадмия может достигать 30-50 мг. Главным “хранилищем” кадмия служат почки (30-60 % всего количества) и печень (20-25 %). Остальной кадмий находится в поджелудочной железе, селезенке, трубчатых костях, а также других органах и тканях.

Кадмий в организме находится, в основном, в связанном состоянии - в комплексе с МТН. Кроме того, Cd может связываться и с высокомолекулярными белками (например, с α -2-глобулином). Он способен замещать цинк в биохимических реакциях, например, выступать как индуктор или, наоборот, ингибитор цинксодержащих белков и ферментов. Кадмий является антагонистом кальция и железа и активно замещает эти элементы (например, в костной ткани). Поэтому недостаток в организме цинка, железа и кальция может привести к 2-3 кратному повышению усвояемости Cd из желудочно-кишечного тракта (до 15-20%) и реализации токсического действия.

Физиологическая роль кадмия до сего времени не установлена, хотя он обнаруживается в организме практически у всех животных (у наземных на уровне в среднем около 0,5 мг/кг веса, а у морских - от 0,15 до 3 мг/кг). Известно, что кадмий влияет на углеводный обмен, на синтез гиппуровой кислоты в печени, на активность некоторых ферментов, а также на обмен цинка, меди, железа и кальция в организме. Некоторые исследования позволяют предполагать, что микроколичества кадмия в пище могут стимулировать процессы роста у млекопитающих, на основании чего в некоторых работах кадмий относят к условно-эссенциальным микроэлементам, хотя эта позиция весьма дискуссионна [450].

В связи с широким использованием кадмия в промышленности, производстве никель-кадмиевых батарей, краси-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

телей и стабилизаторов полимерных материалов, повсеместным попаданием в отходы, за последние десятилетия он вошел в число глобальных загрязнителей окружающей среды. Cd обнаруживают в воздухе, воде пищевых продуктах и, кроме того, в табачном дыме. Не случайно, в литературе описаны многочисленные случаи острых и хронических отравлений, а Международным агентством по исследованию рака (IARC) он был классифицирован как канцероген.

Кадмий (Cd) является токсичным металлом, поражающим легкие, печень, почки и семенники при острой интоксикации, а также обладает нефротоксичностью, вызывает нарушения иммунной, костно-мышечной систем и опухолевый рост при хроническом воздействии. В патогенетических механизмах развития интоксикаций нередко участвуют АФК, вызывающие оксидативный стресс. J. Liu et al. [452] приводят прямые доказательства генерации свободных радикалов у интактных животных после острой экспозиции Cd, а также обсуждают вероятность их участия в патогенезе вызванной Cd хронической металлопатии и канцерогенезе. Генерируемые при действии Cd супероксидный анион, перекись водорода и гидроксильные радикалы, в условиях *in vivo* обнаружены методом спектрального электронного спинового резонанса. Процесс образования этих АФК часто сопровождается активацией чувствительных к окислительно-восстановительным изменениям транскрипционных факторов, таких как NF- κ B, AP-1 и Nrf2, и изменением уровня экспрессии ROS-зависимых генов.

Большинство исследователей согласно, в принципе, с гипотезой относительно важной роли оксидативного стресса в остром отравлении Cd. Однако, что касается продолжительного воздействия Cd в экологически обусловленных малых дозах и концентрациях, то здесь прямых доказательств часто оказывается недостаточно. Изменения в связанной с генерацией АФК экспрессии генов при хронической экспозиции Cd также менее значительны, по сравнению с острым отравлением. Это, вероятно, сопряжено с индукцией синтеза таких адаптогенов и антиоксидантов, как, например, МТН и глутатион, которые играют ключевую роль в механизмах

адаптации при хроническом воздействии Cd и уменьшают степень развития индуцированного им оксидативного стресса. В трансформированных Cd в результате длительной экспозиции клетках с помощью флуоресцентных зондов обнаруживается меньше сигналов АФК. Приобретенная толерантность к апоптозу вызывает у поврежденных клеток способность к пролиферации с одновременными оксидативными повреждениями ДНК, что может привести к развитию опухолей.

Таким образом, в результате острого отравления кадмием образуются АФК, которые играют важную роль в повреждении тканей. Адаптация к хроническому воздействию Cd снижает продукцию АФК, но приводит к экспрессии аберрантных генов, включает другие механизмы в процесс развития отравления, существенно изменяет состав и соотношение биохимических, морфофункциональных нарушений и их маркеров при хронических кадмиевых токсикозах.

Интегральное представление о распределении и выведении Cd из организма при ингаляционном и пероральном путях поступления дано R.K. Zalups и S. Ahmad [453], что можно проследить при ознакомлении с рис. 26.

Из представленных на рисунке данных видно, что в процесс поглощения, накопления и выведения Cd могут быть вовлечены печень, почки, поджелудочная железа, тонкий и толстый кишечник. Однако, магистральным путем безусловно является триада: кровь – печень – почки.

Прямые токсические эффекты кадмия вызваны генерированием АФК и повреждением ДНК, хотя его генотоксичность невысока. Это не исключает наличия отдаленных эффектов экспозиции кадмием, с которым связывают развитие рака легких, простаты и яичек. На клеточном уровне он нарушает процессы пролиферации и дифференциации клеток, а также вызывает апоптоз. В обзоре G. Vertin и D. Averbeck [454] обращается особое внимание на индукцию повреждений ДНК, нарушение фолдинга белков и проницаемости клеточных мембран, ингибирование процессов репарации ДНК разных типов и индукцию апоптоза. Подчеркивается важ-

скота уровень всасывания кадмия из желудочно-кишечного тракта достигает 16 %. Вероятно, исходя из этих соображений, экспертами совместной комиссии ФАО и ВОЗ установлен показатель временного переносимого недельного потребления для Cd на уровне 7 мкг/кг массы тела человека (т.е. в среднем 1 мкг/сутки на 1 кг).

Хотя потребление загрязненной Cd пищи является одним из наиболее важных источников его поступления в организм, многие детали функционирования кишечного механизма поглощения этого металла остаются недостаточно изученными. Основываясь на концепции двух различных стадий кишечной абсорбции Cd, В. Elsenhans et al. [457] показали, что Cd характеризуется высокой скоростью накопления в слизистой оболочке кишечника и низкой скоростью диффузионного переноса в кровь. Уже частично в кишечнике, а затем (в основном) в печени Cd связывается с МТН. Образующий Cd-МТН постепенно транслоцируется в проксимальные канальцы почек, которые являются основным органом-мишенью, где, главным образом, проявляется хроническая токсичность Cd. Процесс носит дозозависимый характер: при низких уровнях Cd в пище металл быстро накапливается преимущественно в почках и в меньшей степени в печени, тогда как при высоких дозах накопление металла происходит преимущественно в печени. В обоих случаях металл представлен, в основном, в виде Cd-МТН, в том числе после перорального и парентерального (внутривенного) введения Cd и его комплекса с МТН. При этом синтезируемый в кишечнике МТН и образующий Cd-МТН комплекс могут быть, по крайней мере частично, ответственны за накопление пищевого Cd в почках. Образующий в кишечнике эндогенный МТН должен проникнуть на серозную сторону слизистой кишки и поставлять Cd-МТН в другие органы, обеспечивая облегченный транспорт Cd в почки, как это было показано авторами в опытах на крысах *in vivo* и на препаратах кишечника *in vitro*.

Сложная и многокомпонентная система всасывания кадмия в кишечнике, которая является начальным, чрезвычайно важным этапом для развития кадмиевого металлотоксикоза, иллюстрируется схемой, представленной на рис. 27.

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

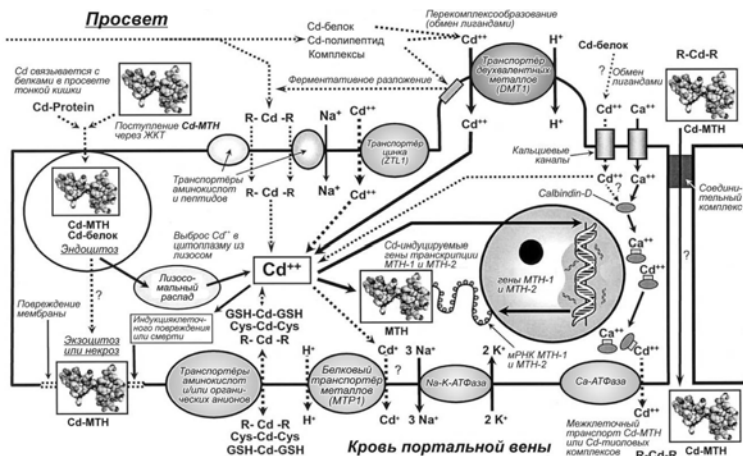


Рис. 27. Схематическое изображение потенциальных механизмов, участвующих в люминальном и базолатеральном транспорте Cd в энтероцитах тонкой кишки [453].

В зависимости от источников поступления Cd в организм, могут образовываться разные формы Cd, которые контактируют с люминальной мембраной энтероцитов. Одним из потенциальных механизмов, участвующих в захвате Cd энтероцитами, является эндоцитоз белков, с которыми связан Cd, в том числе МТН. Однако, имеется относительно мало информации о роли эндоцитоза в поглощении Cd из просвета кишечника в энтероциты. Высказывается предположение, что в этом процессе могут участвовать также Na^+ -зависимые и независимые транспортеры аминокислот и олигопептидов [458, 459]. Эта концепция базируется на известных фактах транспорта ртути конъюгатами цистеина в эпителиоцитах проксимальных канальцев почек. Поскольку подобные системы есть в энтероцитах, они могут быть также вовлечены в транспорт Cys-содержащих олигопептид-S-конъюгатов и/или Cys-S-конъюгатов Cd в тонкой кишке. Охарактеризованный относительно недавно транспортер двухвалентных металлов 1 (DMT1), может участвовать в поступлении Cd в энтероциты [460]. Этот транспортер экспрессируется на люмене плазматической мембраны и участвует в

абсорбции негемового железа (Fe^{+2}) в кишечнике. DMT1 обладает необычайной способностью транспортировать широкий спектр ионов металлов, в том числе Fe^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , и Pb^{+2} . Образующийся в просвете кишки комплекс Cd-DMT1 транспортируется в цитоплазму энтероцитов. Подобная картина может также наблюдаться при взаимодействии кадмия на люминальной мембране с транспортерами цинка, в частности, переносчиком Zn - ZTL1, который недавно был выделен из мембраны энтероцитов [461].

Накоплен большой экспериментальный материал, показывающий участие Ca-каналов в накоплении Cd гепатоцитами, хотя в других типах клеток такое взаимодействие не было установлено. Например, V. Souza et al. [462] показали, что блокаторы Ca-каналов несколько понижают уровни Cd, хотя и не во всех клетках. Движение Cd через Ca-каналы должно привести к конкурентному взаимодействию между этими двумя металлами. Они действительно взаимодействуют во многих системах, но не обязательно по конкурентному механизму. Неконкурентное взаимодействие было показано на примере двенадцатиперстной кишки крысы, где транспорт Ca необратимо замедлялся Cd [463].

Таким образом, многие наблюдения показывают, что прохождение этого металла через клеточные мембраны может включать более чем один механизм. В работе V. Souza et al. [464], например, описаны два таких процесса для кадмия в гепатоцитах, отличающихся их зависимостью от температуры и чувствительностью к ингибиторам. Показано, что только 1/3 Cd, поступающего в гепатоциты, вероятно, использует Ca-каналы [465]. Несомненно, могут сосуществовать разные процессы для транспорта металлов в клетку, где он и проявляет свои токсические свойства.

Накопление Cd в гепатоцитах [466] конкурентно замедляется Zn, так же как некоторыми другими металлами; кальций же в этом случае относительно мало эффективен. Такое взаимодействие указывает на возможное использование кадмием каналов для цинка в этой системе. Кроме того, накопление кадмия в кишечнике связывают с транспортера-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ми цинка. Показано, что подавление накопления цинка кадмием в тонкой кишке крысы не зависело от концентрации Cd и не носило конкурентного характера в описанных авторами экспериментальных условиях [383]. Повышенное поступление в энтероциты цинка после его дефицита в тканях, вызванного нарушением пополнения его пула продуктами питания, не сопровождалась одновременной стимуляцией накопления Cd [467]. Однако J.E. Hoadley and R. Cousins [468] показали, что при постановке опытов *in vitro* на кишечнике в целом, а не только сегментах тонкой кишки, конкуренция между Cd и Zn сохраняется.

Дело заключается в том, что само поглощение Zn в просвете кишечника носит сложный характер. Кинетику транспорта цинка исследовали по поглощению меченого ^{65}Zn из просвета кишечника в слизистую оболочку Zn-дефицитных и Zn-дефицитных крыс [469].

Изолированный кишечник сохраняли васкуляризованным, выделяя его совместно с сосудистым руслом. Поглощение ^{65}Zn включало насыщающий и ненасыщающий компоненты. Насыщающий процесс активизировался дефицитом Zn и протекал с максимальной скоростью (60-180 нмоль Zn г^{-1} ткани 30 мин^{-1}). Дефицит Zn, кроме того, снижал секрецию ^{65}Zn слизистой в просвет кишки, а также увеличивал скорость оборота ^{65}Zn за счет его быстрого всасывания в клетки слизистой оболочки. Большая часть поступающего ^{65}Zn не вовлекалась в краткосрочные процессы секреции или поглощения, и его абсорбция, как и удержание слизистой, не зависели от поступления Zn с пищей. Поглощение слизистой ^{65}Zn было ненасыщающим, включало поступление металла в быстро обмениваемый компартмент и стимулировалось дефицитом Zn. Период полувыведения ^{65}Zn из этого компартмента слизистой составлял примерно 24 мин и был в два раза короче (13 мин) у крыс с дефицитом цинка. Эти особенности поглощения и обмена Zn в кишечнике не могут не влиять на захват, всасывание в нем Cd и проявления последним токсических свойств при пероральном поступлении в организм.

Примеры взаимодействия Cd и Zn приведены A.J. Corrigan и P.C. Huang [470] для клеток яичника китайского хомяка на основе несоответствия между KI (константа, характеризующая ингибирование одним металлом транспорта другого) и KM (константа Михаэлиса) для отдельно взятого металла. Аналогично, в тонкой кишке крыс высокая концентрация Zn должна была бы замедлять транспорт Cd, и наоборот, высокая концентрация Cd — замедлять транспорт Zn. Однако полученные данные не согласуются с представлением о конкурентном торможении, и пока не определено, применима ли простая кинетика Михаэлиса-Ментена к этим системам.

Механизмы, ответственные за прохождение ТМ через мембраны в различных клетках, могут напоминать друг друга, но они не идентичны. Действительно, процессы прохождения Cd в гепатоциты и почечные эпителиоциты отличаются между собой [471]. Отсутствие температурной зависимости в накоплении Cd культурами почечных клеток была объяснена простой диффузией. Однако, маловероятно, что столь активный ион может пересекать заряженную мембрану пассивно, не реагируя с ее компонентами. Прохождение Cd через кальциевые каналы, описанное для питуитарных клеток отличается от такового в глиальных клетках, где используются другие механизмы. Эти процессы отличны также от процесса поглощения Cd в тонкой кишке [472].

Результаты исследования транспорта Cd клетками феохромоцитомы, проведенного Hinkle et al. [472], показали, что транспорт этого металла конкурентно замедляется Са и, вероятно, использует чувствительные к стрессу Са-каналы. Однако, в клетках нейробластомы мыши они в транспорте кадмия не участвуют. Интересный факт установлен при использовании ингибитора Са-каналов дитиазема [473], действие которого приводило к снижению чувствительности креветки к экспозиции Cd, указывая на возможную роль Са-каналов в накоплении Cd в этом биообъекте.

Различие в механизмах транспорта металлов в разных клетках может быть усложнено определенными физиологи-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ческими переменными, такими как возраст и рацион питания. Например, отмечено существенное уменьшение проницаемости слизистой кишечника для металлов с возрастом.

Различные механизмы могут быть ответственны за транспорт ТМ через мембраны не только в разных типах клеток, но и при движении металлов через апикальную и базолатеральную мембраны клетки. Для доказательства таких различий исследовали тонкую кишку крысы [474]. Показано, что апикальное поглощение Cd замедляется цинком, тогда как базолатеральное выведение не связано с низкой концентрацией свободных ионов Zn относительно его общего содержания в клетке. Металлы, образующие комплексы с МТН, поглощались из просвета канальца с помощью относительно специфической транспортной системы [475]. Cd-МТН, напротив, не реагировал с базолатеральной мембраной клетки [476].

Линия клеток печени человека (WRL-68) была использована для исследования кумуляции Cd [477]. Показано, что его накопление в WRL-68 клетках зависит от времени, температуры и концентрации. Быстрая начальная фаза аккумуляции сменялась более медленной стационарной. Транспорт Cd не требовал энергии и 55 % его, возможно, обеспечивалось диффузией. Остальная часть транспорта (45 %) носит энергозависимый характер и, вероятно, протекает с участием ионных каналов и носителей, которые включают взаимодействие иона металла с сульфгидрильными группами. Блокирование Ca-каналов нифедипином и верапамилом замедляло аккумуляцию Cd на 35 % после инкубации в течение 30 минут с 100 мкМ верапамила и 10 мкМ Cd. Эти данные дают возможность предположить, что приблизительно одна треть кадмия поступает в WRL-68 клетки через Ca-каналы.

Приведенные данные показывают, что токсичные металлы используют транспортные пути, которые в физиологических условиях используются для эссенциальных металлов. В целом, линия клеток WRL-68 является достаточно удачной моделью для изучения механизма повреждения клеток кадмием в опытах *in vitro*.

Существует ряд особенностей в действии Cd на женский организм, что связано с гормональной активностью, влияющей, в частности, на уровень экспрессии гена МТН. В одной из немногочисленных экспериментальных работ по этому аспекту проблемы [478] экспрессию мРНК МТН определяли методом ПЦР в реальном масштабе времени. При этом изучали соотношение между индуцированной кадмием экспрессией мРНК МТН-1 и женскими половыми гормонами в печени. Для этого исследовали влияние овариоэктомии и уровня женских половых гормонов на экспрессию мРНК МТН-1 в печени после инъекции Cd, а также последствия старения на экспрессию мРНК МТН-1 в печени мышей после инъекции Cd. Индуцированная кадмием экспрессия мРНК МТН-1 у овариоэктомизированных мышей была больше, чем у контрольных особей (возраст 9 недель). Прогестерон и 17- β -эстрадиол уменьшали индуцированную Cd экспрессию мРНК МТН-1 у овариоэктомизированных мышей (возраст 9 недель). Кроме того, экспрессия мРНК МТН-1 у самцов мышей была больше, чем у самок (возраст 9 недель). Однако половые различия в экспрессии гена не наблюдались в более молодом (4 недели) или старшем (46 недель) возрасте. Эти результаты позволяют предположить, что на экспрессию мРНК МТН-1 в печени после инъекции Cd влияют женские половые гормоны. Кроме того, была изучена взаимосвязь между уровнями МТН и влиянием кадмия на оплодотворяющую способность и фертильность. Показано [479], что экспозиция низкими уровнями кадмия снижает у экспериментальных животных способность к воспроизведению потомства. Самцы особенно чувствительны к нему во время сперматогенеза, самки – в предимплантационный период беременности.

Для исследования роли МТН в токсичности Cd проводили эксперимент на трансгенных мышах с гиперэкспрессией МТН-1, у которых резко увеличен базальный уровень мРНК МТН-1 и самого МТН. Трансгенным и контрольным самцам внутривенно вводили Cd. Инъекция 7,5 мкмоль Cd/кг не оказывала видимого влияния на гистологическую картину, как трансгенных, так и контрольных мышей. Однако, уже при 10 мкмоль Cd/кг быстро наступали гистологические изменения

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

и тестикулярный некроз у животных обеих групп. Трансгенные и контрольные самки спаривались с идентичными самцами, а затем беременным самкам вводили кадмий (30-45 мкмоль Cd/кг) в период имплантации бластоцисты (4-й день гестации). В обеих группах инъекция кадмия уменьшала количество развившихся беременностей. Гиперэкспрессия МТН мало влияла на этот процесс, что, по мнению авторов, свидетельствует о несущественной защитной роли данного белка от токсического воздействия кадмия на оплодотворение. Эта позиция нуждается в дополнительном экспериментальном подтверждении.

Реализация канцерогенного действия кадмия в определенной мере связана с обеспечением организма селеном, хотя механизмы их взаимодействия изучены недостаточно. Z.Z.Wahba et al. [480] определяли последствия воздействия селена на токсикокинетику кадмия и на способность кадмия индуцировать синтез МТН. Для оценки защитного действия селена при острой экспозиции кадмием самцам крыс линии Вистар (WF/NCr) давали селен (в форме SeO_2 в дозе 10 мкмоль/кг, субкутанно) за 24 ч до, одновременно или через сутки после введения кадмия (в виде CdCl_2 в дозе 45 мкмоль/кг, субкутанно). За период двухнедельной экспозиции эта доза кадмия оказалась летальной для 6 из 10 крыс, в то время как 100 % затравленных кадмием крыс, получавших селен, выжили. У крыс-самцов, получавших Cd, отмечено увеличение массы тестикул, тестикулярные отеки, которые предотвращались одновременным введением селена. В то же время селен усиливал накопление кадмия в печени (на 23 %), тестикулах (на 145 %), и эпидидимисе (на 35 %) через сутки после введения, но уменьшал накопление кадмия в почках более чем на 50 %, т.е. влиял на токсикодинамику кадмия. Авторы считают, что механизм защиты селеном от острого воздействия кадмия не связан с индукцией МТН, несмотря на заметное увеличение содержания кадмия в печени. Такая позиция представляется дискуссионной, поскольку видимое отсутствие роста содержания МТН в печени могло быть обусловлено разными причинами. Кроме того, установленный авторами факт мог быть результирующим показателем, ин-

тегрирующим действие разнонаправленных векторов. Эти факты требуют дальнейшей валидизации и углубленных исследований.

Распределение алиментарного кадмия в органах и системах было исследовано в работе [481] на крысах, получавших с пищей Cd-MTH или CdCl₂ в течение 4 недель. Экспериментальные рационы содержали 3, 10, 30 мг Cd/кг в виде Cd-MTH или 30 мг Cd/кг в виде CdCl₂. Изучали содержание Cd в печени и почках после экспозиции низкими дозами Cd-MTH и CdCl₂ (1,5 и 8 мг/кг Cd). Введение Cd-MTH привело к увеличению концентрации Cd в печени, почках и слизистой оболочке кишечника. У крыс, получавших 30 мг Cd/кг в виде Cd-MTH, происходило меньшее накопление Cd в печени и слизистой оболочке кишечника, чем у крыс получавших 30 мг/кг CdCl₂. Накопление Cd в почках крыс, получавших 30 мг/кг, до 28 дня не зависело от формы Cd. При более низких уровнях Cd в рационе (1,5 и 8 мг/кг), относительно больше Cd накопилось в почках, хотя даже при этих дозах отношение Cd почки/печень более высоко для Cd-MTH, чем для CdCl₂. Уровни MTH в слизистой оболочке кишечника были относительно постоянны, но всегда выше после экспозиции CdCl₂, чем после экспозиции Cd-MTH. Уровни MT в печени и в почках увеличились после экспозиции CdCl₂ или Cd-MTH. Хотя уровни MT в печени были более высоки после всасывания CdCl₂ (30 мг/кг), чем после всасывания Cd-MTH (30 мг/кг), концентрации MTH в почках были одинаковы для обеих групп. Фактически на 7 день воздействие Cd-MTH привело к немного более высоким уровням MTH, чем воздействие CdCl₂, что предполагает прямое накопление экзогенного Cd-MTH в почках. После пероральной экспозиции Cd-MTH в пище имеет место относительно более высокое накопление Cd в почках. Однако, вторичное накопление в почках после перераспределения Cd из печени могло бы быть ниже, чем после экспозиции CdCl₂. Выяснение, какое из этих двух явлений является решающим в уровне нефротоксичности Cd при длительном потреблении кадмия с пищей, помогло бы определить токсикологический риск при хроническом поступлении в организм биологически связанного Cd (напри-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

мер, при питании печенью экспонированных кадмием домашних животных).

Экспозиция белых крыс малыми дозами кадмия приводит к развитию адаптивной толерантности к последующему введению летальных доз кадмия с соответствующим сдвигом кривой доза-ответ. Предварительное введение пороговых доз кадмия одновременно защищает от продуцируемой высокими дозами металла гепатотоксичности. Защитным механизмом при введении малых доз кадмия является повышение в 10-50 раз индуцируемого ими синтеза МТН в печени. Животные с трансгенной гиперэкспрессией МТН более резистентны, чем нокаутные по МТН животные как в плане гепатотоксичности, так и устойчивости к действию смертельных доз кадмия. Проведенные С. D. Klaassen и J. Liu исследования [482] интересны также в том отношении, что они установили широкий спектр защитных функций МТН, в том числе и по отношению к органическим токсикантам, не содержащим металл. Индукция в печени МТН цинком защищает мышей от вводимого гепатотоксиканта — четыреххлористого углерода.

Постулируемая концепция базируется и корреспондируется с результатами экспериментальных исследований по изучению взаимосвязи кадмиевой интоксикации с углеводным обменом и нефротоксичностью. Однократная внутривенная инъекция мышам Cd-MТН и CdCl₂ приводила к различной по степени выраженности и качественным показателям нефропатии у мышей. Cd-MТН увеличил экскрецию глюкозы и белка с мочой. Эта дисфункция наблюдалась при низкой дозе 0,2 мг Cd/кг. Напротив, почечная функция не изменялась при введении CdCl₂, даже в таких высоких дозах, как 3 мг Cd/кг. Cd-MТН накапливался почти исключительно в почках, тогда как CdCl₂ — в печени. Комплекс Cd-MТН даже при более низкой концентрации кадмия в почках (чем после введения CdCl₂) вызывал нефротоксический эффект, что не отмечено после введения максимальной дозы CdCl₂, не вызывающей нефротоксического действия. Методом световой микроскопии с ауторадиографией показано, что кадмий из Cd-MТН (0,3 мг Cd/кг) избирательно накапливался в сегмен-

тах S1 и S2 извитых проксимальных канальцев, тогда как Cd из CdCl₂ (в дозе 3 мг Cd/кг) одинаково накапливался во всех сегментах извитых и прямых проксимальных канальцев. Концентрация Cd в извитых проксимальных канальцах была выше после введения CdCl₂, чем после воздействия Cd-MTH. Более высокая концентрация Cd обнаружена в нефроэпителиоцитах базального и апикального отделов после введения CdCl₂, чем после воздействия Cd-MTH. Следовательно, различия в нефротоксическом действии Cd-MTH и CdCl₂ не являются следствием разных концентраций кадмия в клетках-мишенях, а обусловлены природой этих соединений [483]. Вероятно, связывание кадмия с МТН вызывает изменение токсикокинетики металла в организме животных и отражает взаимосвязь этих показателей по типу «время-эффект».

В работе [484] показано, что введение дополнительных количеств кальция/фосфора (Ca/P), цинка (Zn) и железа (Fe²⁺) в рацион защищает от накопления и токсичности Cd для крыс при введении неорганической соли металла. Крысы экспонировали CdCl₂ в дозе 1,5 мг Cd/кг или 8 мг Cd /кг в виде Cd-MTH в течение 4 недель. Введение Cd привело к дозозависимому накоплению Cd в стенке кишечника, печени и почках. Общее содержание Cd в печени и почках после экспозиции Cd-MTH было ниже, чем после экспозиции CdCl₂. После дополнительного введения микроэлементов у крыс, экспонированных низкими дозами кадмия, показатель относительного распределения почки/печень возрастал. Однако это отношение было всегда более высоким при введении Cd-MTH. Введение микроэлементов (Ca/P, Zn²⁺ и Fe²⁺) способствовало снижению накопления кадмия, поступающего как в виде CdCl₂, так и Cd-MTH. При этом защитный эффект составлял при введении доз 1,5 мг Cd/кг и 8 мгCd/кг для Cd-MTH 72 и 75 %, а для CdCl₂ 85 и 92 %, соответственно. Одновременно показано, что защитный эффект минеральной смеси по отношению к Cd-MTH обусловлен, главным образом, наличием в смеси Fe²⁺.

Японские ученые T.Koizumi et al. [485] исследовали влияние преэкспозиции Zn или Cd *in vivo* на цитотоксичность и изменение клеточного pH, индуцируемые Cd в изолирован-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ных гепатоцитах и тестикулярных клетках Лейдига. Такого рода предэкспозиция обоими металлами приводила к синтезу МТН в гепатоцитах, но не в тестикулярных клетках. Оба варианта предэкспозиции приводили к снижению цитотоксичности Cd в гепатоцитах и предотвращал индуцированную Cd ацидификацию клеток. Стимуляция ацидификации клеток Лейдига имела место только в результате предэкспозиции крыс кадмием. Экспозиция *in vitro* гепатоцитов интактных крыс пробенецидом (ингибитором обмена $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$), также снижало индуцированную Cd ацидификацию. По мнению авторов, это свидетельствует о превентивном действии МТН на индуцированную кадмием ацидификацию путем регуляции обмена $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ через Cl^- -ионные каналы (вероятно за счет взаимодействия МТН с системой транспорта анионов).

В целом, результаты исследования показывают, что цитотоксичность кадмия для различных клеток может реализовываться путем изменений в системах ионного транспорта через плазматические мембраны. В частности, к таковым относится анионный транспортер $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, который может лежать в основе наблюдаемой при кадмиевой интоксикации ацидификации клеток. Индукция МТН может предотвращать цитотоксическое действие кадмия в гепатоцитах крысы, путем регуляции транспорта ионов через плазматические мембраны наряду с известным механизмом внутриклеточного связывания ионов токсичных металлов.

Защитная роль МТН и глутатиона при острой гепатотоксичности кадмия (Cd) были исследованы *in vitro*. Срезы печени были культивировали в буфере, содержащем хлорид кадмия (20-50 ppm), при 37 °C в течение 3 часов. Жизнеспособность срезов определяли по изменению внутриклеточных концентраций калия и глутатиона. Отмечено дозозависимое уменьшение обоих показателей. Прединдукция МТН (100-кратное увеличение) инъекцией сернокислого цинка (30 мг Zn на кг массы тела) *in vivo* приводила к сохранению концентрации внутриклеточного K и росту концентрации глутатиона в срезах печени. Инъекция бутионинсульфоксимины (BSO) (4 ммоль/кг веса тела) крысам вызывала снижение концентрации глутатиона в печени (на 90 %) с эффектом усиления

токсичности Cd, что наблюдалось на срезах печени. Такое увеличение токсичности может быть полностью компенсировано индукцией МТН путем предварительной обработки цинком. Клеточное накопление Cd оставалось неизменным во всех экспериментах. Эти результаты демонстрируют тот факт, что токсичность Cd в печени может определяться его связыванием с внутриклеточными сульфгидрильными группами и внутриклеточным глутатионом, а повышенные уровни МТН могут обеспечить защиту против цитотоксичности Cd в печени. Кроме того, даже при низких уровнях восстановленного глутатиона МТН мог частично защитить гепатоциты от цитотоксичности Cd [486]. Последнее подтверждается наличием в элюатах двух наиболее крупных фракций, в которых кадмий связан с МТН и глутатионом.

Линии клеток, наиболее стойких к Cd, отличаются увеличенным синтезом МТН. Однако, присутствие высоких концентраций МТН, который эффективно «захватывает» ионы кадмия в клетке, препятствует исследованию альтернативного транспорта кадмия в клетках, устойчивых к Cd. Для изучения механизмов действия кадмия и роли МТН в них полезно использовать клетки мышей или культуры тканей, полученные от мышей с отсутствующим геном МТН (0-МТН). Первичные культуры клеток, полученные от эмбрионов 0-МТН-I/II мыши, показали повышенную чувствительность к кадмию, по сравнению с контрольными клетками. Полученные устойчивые к Cd 0-МТН клетки характеризовались меньшим накоплением кадмия за счет снижения его поглощения. Применение техники мультирадиоактивной индикации позволило показать, что поглощение Mn (II) было также заметно уменьшено в Cd-устойчивых 0-МТН клетках. Кинетика конкуренции поглощения Cd (II) и Mn (II) в этих клетках показала, что транспортная система с высоким сродством к Mn (II) используется, по крайней мере частично, для поглощения Cd (II). Таким образом, использование 0-МТН клеток позволило обнаружить новую транспортную систему кадмия [487].

T. Kaji et al. исследовали влияние цинка на цитотоксичность кадмия для сосудистых эндотелиоцитов в культуре клеток по показателю роста уровня выведения из клеток

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

меченого [^3H] аденина [488]. Авторы считают, что ранним проявлением цитотоксичности кадмия является гидролиз АТФ. Кадмий в концентрациях 2 мкМ и выше значительно увеличивал высвобождения [^3H] аденина, тогда как цинк в концентрации 80 мкМ и ниже не вызывал такой реакции после 24-часовой инкубации. Индукция МТН кадмием отмечена при концентрациях последнего 0,1 мкМ и выше. В то же время индуцированный синтез МТН не происходил при действии цинка в концентрации до 300 мкМ. Однако цинк при концентрации 10 мкМ и выше значительно снижал цитотоксичность, обусловленную кадмием в концентрациях 2 и 5 мкМ. Это может быть также свидетельством включения отличного от МТН механизма цитопротекции цинком при вызванной кадмием цитотоксичности.

Предотвращение цинком цитотоксичности кадмия отмечалось также в присутствии 1 мкМ циклогексамида. Последний, как известно, является индуктором гидролиза АТФ в клетках. Цинк вызывал существенно меньшее накопление кадмия в клеточном слое при значительном накоплении в нем цинка. В противоположность этому отмечено повышение содержания кадмия в цитозольной фракции клеток при одновременной экспозиции их кадмием и цинком. Методом гель-фильтрационной хроматографии цитозоля клеток показано, что кадмий накапливается во фракциях высокомолекулярных белков и МТН. Уровень связанного с МТН кадмия под действием цинка не возрастал, тогда как связывание его с фракцией высокомолекулярных белков в цитозоле при экспозиции обоими металлами снижалось. Авторы предлагают вероятный механизм защиты цинком эндотелиоцитов от цитотоксичности кадмия: снижение накопления кадмия в клеточных фракциях, являющихся мишенями, и во фракции высокомолекулярных белков в цитозоле клеток. Этот механизм предполагает, что имеет место как снижение внутриклеточного накопления кадмия, так и его повышенное выведение из клеток за счет высокого уровня индуцированного кадмием МТН.

M.S.Yang et al. [489] вводили мышам однократно внутрибрюшинно 2 мг/кг CdCl_2 . В течение 7 дней изучали кинет

тику изменения содержания в ткани кадмия, меди и цинка, их распределение в клеточных белковых фракциях, а также экспрессию гена МТН в печени мыши. Результаты показали, что Cd быстро накапливался в печени мыши. Воздействие Cd вызывало экспрессию м-РНК МТН. Большинство Cd было связано с МТН. Со 2 дня после воздействия Cd небольшое количество металла было также связано с высокомолекулярными (HMW) белками. Содержание цинка в ткани снижалось в первые 8 часов, а затем значительно увеличилось в течение 6 дней. Большая часть цинка была связана с высокомолекулярной белковой фракцией. Количество меди в ткани не изменялось, а было обнаружено лишь ее перераспределение между различными белковыми фракциями. Если у контрольных животных медь была главным образом связана с высокомолекулярными белками, то уже на второй день часть ее обнаруживалась во фракции МТН. В целом, показано, что Cd оказывал существенное влияние на распределение эссенциальных металлов в клетках, что может лежать в основе нарушения клеточных функций при кадмиевой интоксикации. Указанная работа представляет интерес в плане роли высокомолекулярных белков в связывании кадмия в клетках и их защитной роли, наряду с протекторным действием МТН.

Систематические исследования токсических свойств кадмия и других ТМ проводит в течение многих лет группа К.Д. Клаассена. В частности, в одной из последних работ [490] показано, что МТН оказывает незначительное влияние на гастроинтестинальную абсорбцию кадмия, но играет ключевую роль в накоплении в тканях и снижении билиарной экскреции кадмия. Длительная ретенция и продолжительный период полувыведения кадмия из организма взаимосвязаны с образованием комплекса кадмия с МТН. Индукция МТН играет защитную роль при остром отравлении Cd, снижая его токсичность для тканей печени и легких.

Поражение печени, почек, легких, костной и иммунной систем, вызываемое хроническим отравлением Cd, в значительной мере купируется индукцией внутриклеточного МТН. Хотя МТН играет ключевую роль в защитных функциях организма при отравлении кадмием, существенные индивидуаль-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ные колебания уровней экспрессии МТН представляют одну из причин значительных различий в индивидуальной чувствительности людей по отношению к токсическому действию кадмия.

В опытах на трансгенных мышах показано, что плацентарный МТН снижает передачу Cd от матери к плоду. У мышей дикого типа, с повышенной экспрессией МТН (МТН-1*) и его отсутствием (0-МТН), при воздействии низких доз Cd отмечено значительное накопление металла в печени и почках, независимо от группы животных. Одновременно Cd обнаруживался и в плаценте [491]. Беременным самкам за 2 дня до родов вводили радиоактивный хлорид ^{109}Cd (0,6 нг Cd/мышь). Через 24 ч измеряли радиоактивность, содержание МТН и кадмия в органах матерей и плодов. Показано, что Cd накапливается, главным образом, в печени и почках матери (80 % введенной дозы), тогда как его уровень в плодах незначителен (0,1-0,3 %). При этом в плодах 0-МТН мышей содержание Cd было в 3-10 раз выше, чем у контрольных. Накопление кадмия в плодах мышей с повышенной экспрессией МТН (МТН-1*) и в плодах самок дикого типа отличалось незначительно. Таким образом, роль плацентарного МТН, как барьера для Cd, является не до конца понятной. Была определена локализация МТН в плаценте этих мышей. С помощью иммуногистохимического анализа подтверждено наиболее высокое содержание МТН в печени самок группы с гиперсекрецией МТН-1* (4 мг/г). У контрольных мышей его уровень был существенно ниже, а у 0-МТН мышей МТН не обнаружен. Такая же зависимость имела место в плаценте, нервной ткани, клетках гликогена, гигантских трофобластах и децидуальных клетках матери.

Трофобласты плаценты человека в культуре использовали для исследования взаимосвязи плацентарного транспорта цинка с экспозицией кадмием. Клетки обрабатывали ацетатом кадмия (0-2 мкМ) в течение 18 часов. Содержание МТН в первичной культуре трофобластов индуцировалось кадмием. После инкубации с ^{65}Zn в течение различного времени после предэкспозиции кадмием его накопление клетками носило дозозависимый характер. Причем наибольшее

количество Cd в цитозоле обнаружено во фракции МТН. По мнению авторов, индуцированный кадмием МТН связывает цинк в трофобластах, делая этот эссенциальный элемент менее доступным для поступления в кровоток плода [492].

Токсичность кадмия для лабораторных животных и культур клеток проявляется в нарушениях передачи интра- и интерцеллюлярных сигналов, индукции апоптоза, повреждении транспортных систем и защитных функций МТН, хотя эти механизмы *in vivo* до конца не изучены. Среди повреждаемых Cd ферментов выделяют протеинкиназу С, другие активируемые митогенами протеинкиназы с регуляторной функцией ц-АТФ. Экспозиция кадмием вызывает дозозависимые некроз и апоптоз [493, 494].

Если по отношению к эссенциальным металлам регуляция цинком осуществляется преимущественно через МТН, то толерантность к цитотоксичности кадмия может осуществляться цинком, как по включающему МТН, так и по альтернативному механизму. Это, в частности, показано Mishima A. et al. [495] на культуре клеток печени *Chang*. После экспозиции клеток $ZnSO_4$ сравнивали порог действия кадмия в зависимости от наличия или отсутствия цинка. Предварительно обработанные цинком клетки были существенно более стойкими к воздействию кадмия даже тогда, когда экстрацеллюлярный уровень цинка был недостаточным для индукции МТН. Нагрузка цинком снижала накопление кадмия и повышала индукцию МТН. Авторы пришли к заключению, что включение альтернативных путей детоксикации происходит в тех случаях, когда уровень экстрацеллюлярного цинка находится ниже порога индукции МТН.

В работе [496] изучали отдаленные последствия воздействия кадмия на печень и почки. Крысам вводили хлорид кадмия (0,228 мг Cd/кг в течение 3 дней в неделю ip), в течение одного года. Значительное накопление кадмия наблюдалось как в печени (183 ± 40 мкг/г печени), так и в почках (92 ± 17 мкг/г почек). У экспериментальных крыс были значительно увеличены азот мочевины и уровни креатинина в сыворотке, что является показателем почечной дисфункции,

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

в то время как функции печени были повреждены незначительно. Гистологические изменения в печени проявлялись во внутритканевом фиброзе с минимальным клеточным некрозом. В паренхиме почек наблюдалась дегенерация проксимальных канальцев и воспалительная инфильтрация клеток. Перекисное окисление липидов в печени и почках, определяемое по ТБК-тесту у крыс, экспонированных кадмием, и контрольной группой существенно не различалось. Содержание глутатиона существенно повышалось у экспонированных кадмием крыс в печени и почках ($p < 0,001$). Поскольку авторы не изучали содержание МТН в исследованных тканях, полученные результаты не исключают его вклада в обнаруженную ими существенно более высокую концентрацию свободных тиоловых групп.

Кроме того, токсичные металлы оказывают воздействие на распределение других микроэлементов. Например, последствия введения кадмия на метаболизм микроэлементов были изучены на кроликах [497]. Животным вводили подкожно $CdCl_2$ в кумулятивных дозах 20 и 30 мг/кг в течение 34 недель. Уровни цинка в плазме и в тканях возрастали во время воздействия Cd в дозе 1 мг/кг и уменьшились после 15 и 20 мг/кг, а содержание цинка в моче значительно увеличивалось. Содержание меди в плазме увеличивалось после введения Cd в дозе 1 мг/кг и уменьшалось после введения Cd в дозе 15 мг/кг, а содержание меди в моче увеличилось. В то же время содержание меди в печени и почках увеличивалось при введении Cd в дозе 10 и 15 мг/кг. У кроликов, которым вводили кадмий и медь в течение 19 недель, увеличение содержания кадмия, меди и цинка в моче было зарегистрировано позже, чем у животных, которым вводили только Cd. У кроликов, которым вводили Cd в течение 34 недель, начало почечной дисфункции сопровождалось уменьшением содержания кальция в печени и почках, в то время как уровни магния в этих органах снижались постепенно, с увеличением дозы Cd, и уровни железа уменьшались по сравнению с медью. Хром в печени уменьшался до времени появления нарушений в печени, в то время как содержание хрома в почках оставалось неизменным. Подобные измене-

ния были зарегистрированы для уровней кобальта, никеля, марганца, свинца и алюминия. Авторы заключают, что Cd вызывает изменения в метаболизме микроэлементов, которые связаны с его влиянием на биохимические процессы.

Таким образом, приведенные в настоящем подразделе данные свидетельствуют о защитной роли МТН при различных вариантах проявления токсических свойств кадмием при острой и хронической интоксикации, а также в опытах *in vivo* и *in vitro* на широком круге экспериментальных моделей. При этом в большинстве случаев в основе протекторного действия МТН лежат близкие по физиологическому смыслу либо идентичные механизмы. Исключением является развитие индуцируемых кадмием тестикулярных поражений, где существенные генетически обусловленные отличия тестикулярных клеток вызывают изменения в процессах клеточного транспорта кадмия и могут быть причиной высокой чувствительности тестикулярных клеток к действию данного металла.

Детоксикационные функции МТН по отношению к кадмию первично обусловлены высокой аффинностью связывания данного металла с МТН. Однако, это не исключает роли других функций МТН в защите от токсичных эффектов кадмия, таких как поддержание им гомеостаза эссенциальных металлов, гашение активных радикалов кислорода, регуляция экспрессии генов и регенерации тканей.

4.1.2. Ртуть

Ртуть относится к числу элементов, постоянно присутствующих в окружающей среде и живых организмах. Ее содержание в организме человека составляет порядка 13 мг [498, 499]. Относится к тяжелым металлам (атомный вес 200,59). Несмотря на близость электронного строения атома к цинку и кадмию (нахождение в триаде Zn-Cd-Hg в Периодической системе), по своим физико-химическим свойствам ртуть имеет ряд существенных отличий: в нормальных условиях находится в жидком состоянии, обладает очень слабым сродством к кислороду, не образует гидроксидов. В соединениях ртуть проявляет степень окисления +2 и +1

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

(Hg(II) или Hg(I)). Обладая высоким потенциалом ионизации, высоким положительным окислительным потенциалом, ртуть является относительно стойким в химическом отношении элементом. Это обуславливает ее способность восстанавливаться до металла из различных соединений и объясняет частые случаи нахождения ртути в природе в самородном состоянии.

На воздухе ртуть при комнатной температуре не окисляется. В присутствии кислорода в воде ртуть окисляется до ионной формы Hg^{2+} (создавая концентрации до 40 мкг/л). Растворимость ее в воде зависит также от pH раствора. Минимальная растворимость наблюдается при pH=8,0. С увеличением кислотности или щелочности воды она увеличивается.

В природных условиях ртуть обычно существует в трех основных формах: Hg^0 (элементарная или металлическая ртуть), Hg^{2+} (ион двухвалентной ртути), CH_3Hg^+ (ион метилртути), а также в виде гораздо менее распространенного иона Hg_2^{2+} (рис. 28).

Рис. 28. Множественность форм ртути в природных условиях



Химические соединения Hg (II) встречаются в природе

значительно чаще, нежели Hg (I). Ионы Hg²⁺ образуют устойчивые комплексы с биологически важными молекулами. Сулема (ртути дихлорид) не диссоциирует на ионы [500, 501] и благодаря этому легко проникает через мембрану клетки [502]. Именно высокое химическое сродство ртути (II) и ее метилированных соединений к биомолекулам в значительной мере определяет ее токсикологическую опасность [503, 504]. Существует также большое количество ртутьсодержащих органических соединений, в которых атомы металла связаны с атомами углерода. Химическая связь углерода и ртути очень устойчива. Органические соединения ртути образуются обычно за счет ковалентного связывания с атомами углерода таких функциональных групп, как метильная, этильная или фенильная. В окружающей среде преобладает метилртуть CH₃Hg⁺. Она первично образуется путем метилирования ионов ртути микроорганизмами в воде и почве.

Практически все формы ртути являются токсичными для биоты. Существенный риск отравления ртутью сохраняется и для человеческой популяции.

В соответствии с данными ВОЗ [505], в легких поглощается около 80 % ртутного пара, поступающего в дыхательные пути ингаляционным путем. Информация относительно поглощения через легкие других форм ртути у человека недостаточна. В связи со способностью ртути к биоаккумуляции в пищевых цепях, практически все население нашей планеты получает определенное количество ее соединений с продуктами питания. Именно таким путем в 50-х годах прошлого столетия произошло отравление ртутью более 800 японцев, проживавших на берегу залива Минамата, в воды которого поступали ртутьсодержащие отходы, что привело к накоплению токсиканта в гидробионтах и морепродуктах [506]. В желудочно-кишечном тракте всасывается примерно 7 % поступающих с пищей неорганических соединений ртути. Метилртуть в кишечнике поглощается фактически полностью. Хотя принято считать, что большинство форм ртути способно проникать через кожу, количественные показатели остаются недостаточно четкими.

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

В связи с глобальным характером загрязнения окружающей среды ртутью и ее высокой токсичностью, вопросы патогенеза, диагностики, лечения и профилактики ртутных отравлений явились предметом многочисленных исследований и нашли отражение в ряде монографий и обзоров [16, 55, 507].

При попадании ртути в организм человека и животных практически в любой форме может происходить их частичная биотрансформация, схема которой приведена на рис. 29. При этом следует подчеркнуть, что у различных представителей биоты процесс биотрансформации имеет свои отличительные особенности. Многие детали этого сложного и многофакторного процесса до сего времени неизвестны и остаются в центре внимания исследователей.

В транспорте к органам-мишеням и механизмах детоксикации ртути большая роль принадлежит металлотионеинам. Способность МТН к селективному связыванию ртути определяется наличием в нем большого количества реакционноспособных тиолатных групп цистеина. Эти группы биологически неравнозначны, т.к. их реакционная способность зависит от стереохимического строения тиолатных кластеров, которое определяет доступность групп к комплексообраз-

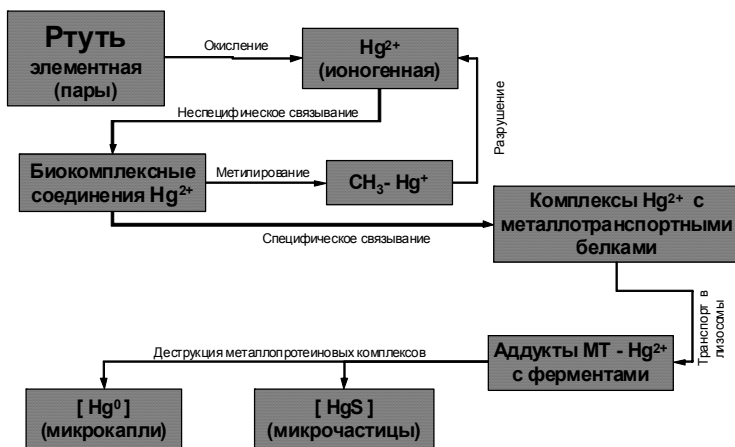


Рис. 29. Пути биотрансформации ртути в организме теплокровных.

разованию. В то же время конформация МТН в растворе не является жесткой, она способна к изменению, которое становится энергетически выгодным при образовании прочных химических связей S-Hg. При этом могут образовываться тетраэдрические, тригональные, планарные, дигональные и полинуклеарные структуры и комплексы, в зависимости от условий реагирования и сопутствующих факторов: pH среды, концентрации ртути, структуры и строения исходного МТН (связывание с апобелком и комплексами Zn-МТН, Cd-МТН заметно отличаются по кинетике, динамике и стереохимии). Этим ртуть существенно отличается от цинка и кадмия, что получило в литературе название «парадокс семейства цинка» [508]. Полагают, что в основе данного явления лежат особенности взаимодействия S-Hg, которое проявляется в структуре и разнообразии тиолатных комплексов ртути.

Биологическая химия ртути рассматривает преимущественно ее координацию с тиолатными группами цистеина с учетом предпочтительного взаимодействия иона металла с «мягкими» лигандами серы. Именно по этому принципу у млекопитающих происходит детоксикация ртути в клетках эпителия проксимальных канальцев почек с участием МТН, которая осуществляется путем образования комплексов с цистеином и последующей секвестрацией токсиканта в лизосомах. На рис. 30 отражены сложные взаимоотношения механизмов поступления, биотрансформации и детоксикации ртути в клетке, в которых МТН занимает одно из центральных мест. Следует подчеркнуть, что участники и ход этих процессов подобны таковым у кадмия, что и легло в основу адаптированного из R. Zalups [509] варианта схемы, представленной на данном рисунке.

Рассмотрение роли МТН в развитии и купировании нефропатий (в первую очередь, вызываемых производственно и экологически обусловленным контактом человека со ртутью и другими тяжелыми металлами) не должно отрываться от системы взаимосвязанных факторов, в основном, белковой природы, которые вовлечены в процессы активации и супрессии рецепторов клеточных мембран и заинтересован-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

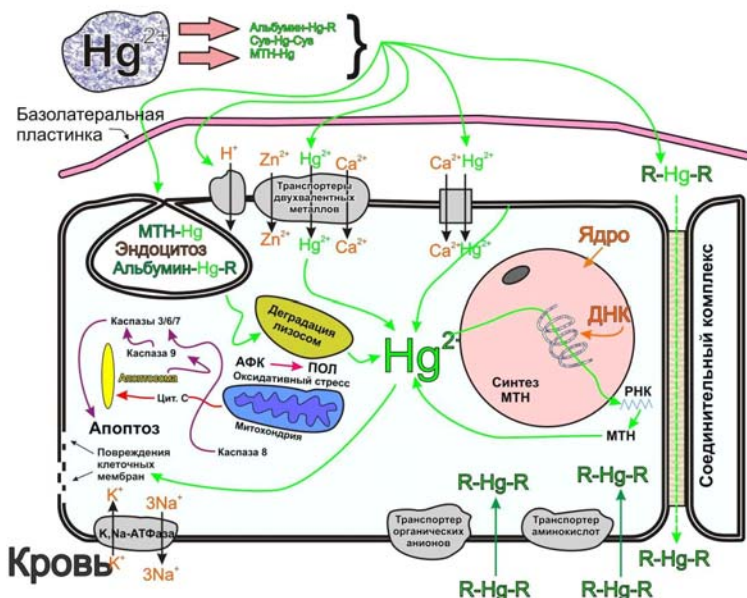


Рис. 30. Схема токсикодинамики и биотрансформации ртути в клетках эпителия проксимальных канальцев почек.

ного ферментного пула клеточных компартментов.

При рассмотрении представленной на рисунке схемы видно, что в токсикодинамике ртути в клетке участвуют практически все клеточные компартменты, ее энергетический и биосинтетический компоненты, формирующие интегральную системы детоксикации и выведения из организма поступающей ртути.

Не случайно, А. Leiva-Presa et al. [510] подчеркивают, что, в отличие от поведения в растворах, в биологических системах и организме человека и животных ведущую роль в проявлениях токсичности играют не стехиометрия и тип координационных связей иона металла с соответствующими лигандами, а компартиментализация металлобелковых комплексов со значительным изменением рН. Важно также учитывать время контакта, которое определяет включение в процессы повреждения и детоксикации разнообразных (вза-

имосвязанных) регуляторных клеточных систем, формирующих систему взаимодействия на молекулярном уровне. Наиболее детально имеющиеся по данной проблеме данные были проанализированы R.K. Zalups [511]. Проведенный анализ охватывает практически все основные аспекты проявления токсических свойств конкретным металлом, и в то же время раскрывает все многообразие механизмов, включающихся в формирование патогенетического процесса (металлонефропатии), в которых активно участвует МТН и образуемые им комплексы с соответствующим токсичным металлом.

Положение о высокой динамичности вместе со сложностью тиолатных комплексов ртути позволяет предполагать наличие специфической стехиометрии и координатной геометрии комплексов Hg-МТН. Вероятно, именно данная особенность может служить объяснением трудностей, возникающих при попытке использования ртути в качестве индикатора при определении МТН в биологических объектах методом насыщения. При моделировании взаимодействия Hg с МТН *in vitro* при относительно высоких концентрациях ртути (1-10 ммоль/л), изучено [508] взаимодействие Hg с комплексом Zn₇-МТН. При рН 7 происходит перекомплексообразование в Hg₁₅-МТН и Hg₁₆-МТН через промежуточную серию Zn-Hg-содержащих комплексов разного стехиометрического состава. Кинетика процесса такова, что полное замещение цинка ртутью происходит за 24 ч. Стадийность этого процесса и зависимость от количества атомов цинка в исходном Zn-МТН комплексе позволяет в известной мере объяснить постулируемую многими авторами регуляторную роль цинка в детоксикации тяжелых металлов МТН. Вероятно, количество обмениваемого цинка определяет интенсивность связывания и последующей элиминации ТМ с участием МТН. Снижение рН до 3 существенно влияет на стехиометрию и структуру образуемых комплексов, изменяя конформацию молекулы МТН. Это может играть важную роль в процессах метаболизации комплекса Hg-МТН в лизосомах *in vivo*. Зависимость состава образуемых комплексов Hg-МТН от времени взаимодействия (кинетика комплексообразова-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ния) подчеркивает поэтапный характер взаимодействия ртути (а вероятно, и других металлов) с белками, осуществляющими транспорт к клеткам-мишеням и вторичное распределение металлов в клетках. Это, в известной мере, определяет осуществление МТН защитных функций, выходящих за рамки транспорта и поддержания гомеостаза эссенциальных и токсичных металлов в клетке.

R. K. Zalups et al. [512] изучали накопление ртути в почках и печени, внутривенное распределение ртути, а также выведение ртути с мочой и калом у крыс, которым вводили внутривенно нетоксичную дозу ртути 0,1 мкмоль/кг в форме двухлористой ртути (HgCl_2) или комплекса Hg-МТН. Между 6 и 72 часами после инъекции, концентрация ртути в почках крыс, которым вводили Hg-МТН, была значительно выше, чем у крыс, которым вводили HgCl_2 . Наибольшие различия в концентрациях ртути в почках у сравниваемых групп крыс имело место через 6 часов после инъекции. В корковой и мозговой зонах почек наиболее высокие концентрации ртути определялись у крыс, которым вводили Hg-МТН. Не обнаружено различий между содержанием ртути во внутреннем и внешнем слоях мозговой зоны почек через 72 ч после введения препаратов. В крови и печени крыс, которым вводили HgCl_2 , содержание ртути было выше, чем при введении Hg-МТН. Крысы, которым вводили Hg-МТН, выделяли в течение 72 часов в восемь раз большее количество ртути с мочой, чем соответствующие крысы, которым вводили HgCl_2 , крысы, которым вводили HgCl_2 , выделяли значительно больше ртути с калом в течение того же самого периода времени, чем крысы, которым вводили Hg-МТН. Таким образом, накопление ртути в почках и печени, а также выделение ртути с мочой и калом значительно отличаются при внутривенном введении неорганической ртути и Hg-МТН.

Повышение уровня металлотиионеина при субхроническом введении различных неорганических соединений ртути (II) наблюдалось нами в эксперименте на белых лабораторных крысах линии Вистар после внутрижелудочного введения солей ртути в дозе 0,1 мг/кг (по ртути). Причем, уровень его экспрессии и межорганное распределение существен-

но отличались при введении различных солей данного токсиканта (рис. 31). Введение фосфата ртути приводило к росту содержания МТН в мозге и печени (в 4 – 6 раз), тогда как при введении азотнокислой соли – в печени и почках (в 4 - 14 раз).

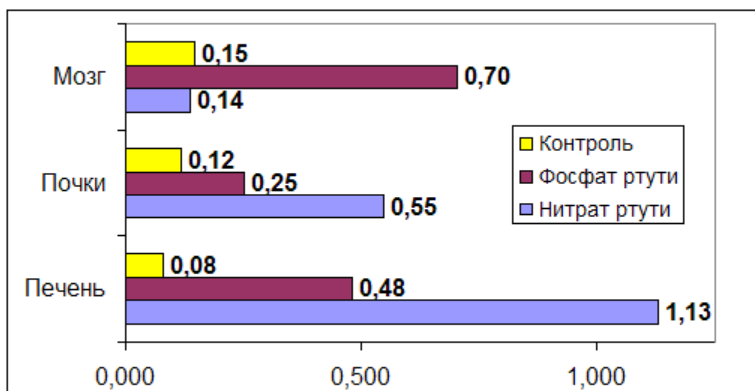


Рис. 31. Содержание металлотиионеина (нмоль/г) в органах крыс после заправки солями ртути 30 дней в дозе 0,1 мг/кг

Yoshida M. et al. [513] исследовали роль плацентарного МТН в передаче ртути от матери к плоду у мышей дикого типа и нокаутных по МТН (0-МТН) после экспозиции парами элементной ртути. Мышей обеих групп экспонировали парами ртути в концентрации 5,5-6,7 мг/м³ в течение 3 часов на последней неделе беременности. Спустя 24 ч после экспозиции накопление ртути в органах-мишенях (кроме мозга) матерей группы 0-МТН было значительно ниже, чем у мышей дикого типа. В отличие от уровней ртути в материнских органах, у плодов 0-МТН мышей, содержание ртути было существенно выше, чем у плодов мышей дикого типа. Концентрации ртути в плаценте были одинаковы. Однако эндогенный уровень МТН в плаценте был выше, чем в других органах (кроме печени). Показано, что у мышей дикого типа большая часть плацентарной ртути связана с МТН. У мышей 0-МТН ртуть была связана с высокомолекулярными белками. Авторы указывают, что полученные ими данные свидетельствуют о защитной роли плацентарного МТН в предотвращении

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

перехода ртути от матери к плоду.

Подобные опыты те же авторы [514] провели для изучения механизма повреждения легочной ткани при кратковременной экспозиции парами металлической ртути (Hg^0). Мышей обеих групп экспонировали Hg^0 в дозе 6,6 и 7,5 мг/ м^3 в течение 3 дней по 4 часа. Данная доза оказалась смертельной для 60 % и более нокаутных по МТН (0-МТН) мышей, тогда как смертности у мышей дикого типа не наблюдалось. У 0-МТН мышей гистопатологические изменения в легких были более выражены. Уровни МТН в легком были повышены у контрольных мышей после экспозиции паром Hg^0 , и большая часть ртути была связана с МТН. Индукция МТН в клетках легочной ткани мышей дикого типа способствовала задержке ртути в зоне ее поступления. Авторы полагают, что индукция синтеза МТН ртутью в легочной ткани играет защитную роль при остром отравлении парами Hg^0 .

Многообразие форм ртути в организме и вызываемых ими токсических эффектов не означает преобладания в патогенезе ртутных интоксикаций неспецифического действия (интегральных эффектов). Детальное изучение симптоматики и морфофункциональных особенностей поражения организма ртутью в клинике и на экспериментальных моделях позволило выделить в качестве специфических для неорганической ртути преимущественно нефротоксический, а для органической – нейротоксический синдромы, которые рассматриваются в соответствующих разделах данной монографии.

Сложность и многофункциональный характер системы транспорта металлов в организме человека и животных до сего времени интенсивно изучается и представляет актуальную междисциплинарную проблему. В этой проблеме важное место принадлежит ртути. Образующиеся в процессе трансмембранного переноса ртути комплексы существенно варьируют в зависимости от концентрации металла в плазме и типа клеток. Среди большого количества нерешенных вопросов следует выделить такие как биологическая значимость и особенности токсических свойств различных по

структуре и содержанию металла Hg-МТН комплексов, участие МТН в процессах биотрансформации ртути, переходу ее из одной формы в другие, в том числе и метилирования ртути в организме млекопитающих.

4.2. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ПОЧЕК

Почки относятся к тем органам, в которых имеет место повышенный синтез МТН [515]. Это может быть связано прежде всего с экскрецией через почки значительного числа общепризнанных индукторов биосинтеза МТН (эссенциальные и токсичные металлы, лекарства, биологически активные эндогенные вещества, в частности, гормоны и медиаторы).

Общеизвестно, что среди токсикантов, обладающих избирательным нефротоксическим действием, важная роль принадлежит тяжелым металлам [516]. Несмотря на многочисленные исследования, механизмы нефротоксического действия ТМ изучены недостаточно. Поэтому не случайно исследованию механизмов действия ТМ на различные структурные отделы и многочисленные физиологические функции почек и мочевыделительной системы в целом посвящено большое количество работ, публикации по результатам которых появляются регулярно в журналах и других периодических изданиях различного биологического и медицинского профиля. Их систематизация и изучение взаимосвязи с содержанием МТН в почках крайне необходимы.

Сотрудниками УкрНИИ медицины транспорта (Одесса) в течение ряда лет выполнялась тема НИР «Принципы формирования нефротоксических эффектов тяжелых металлов: патогенез, методы диагностики, лечения и профилактики нефропатий», результаты которой нашли отражение в ряде публикаций [517, 518, 519]. В частности, было показано, что МТН, наряду с протекторной, могут играть и патогенетическую роль в развитии металлонефропатий [520].

Типичные особенности нефротоксичности ТМ заключаются в том, что, как уже было показано выше, нарушения преобладают в определенных сайтах нефрона, прежде всего в проксимальных канальцах с преимущественным пора-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

жением эпителиальных клеток. Это позволяет предположить, что некоторые отделы нефрона избирательно чувствительны к определенным металлам. Различная чувствительность отдельных сайтов объясняется локализацией молекулярных мишеней, а также транспортных и связывающих лигандов (в т.ч. МТН), которые доставляют металл к мишеням (клеточным рецепторам) в пределах нефрона. Тем не менее, общая схема детоксикации остается единой по своей цели и механизмам ее осуществления: распознавание, связывание, транспорт, биотрансформация и удаление из организма. Значительная часть ее реализуется в детоксикационном аппарате нефрона. Именно от соотношения элементов повреждения, с одной стороны, и защитных (адаптивных и компенсаторных) реакций, с другой, зависит результирующий вектор функционального состояния организма и его систем. В реализации этой схемы и патогенезе металлонефротоксикоза МТН принадлежит ведущая роль. Она осуществляется в строго очерченных пространственно-временных координатах и носит дозозависимый характер.

Это прослежено, в частности, на примере тиолатов ртути, семейство которых по своему структурному разнообразию достаточно велико [510]. Одним из наиболее важных выводов из полученных результатов является положение о том, что у млекопитающих детоксикация ртути в почках осуществляется преимущественно МТН путем комплексообразования с остатками цистеина и последующего удаления из организма путем экзоцитоза, использования дефолиантного механизма удаления предварительно подвергнутых программированной смерти (апоптозу) или некрозу пораженных клеток (прежде всего и главным образом, клеток эпителия проксимальных канальцев). Основную роль в характере патологического процесса (токсичности) при любых поражениях *in vivo* играет не стехиометрия и стереохимия образуемых комплексов, а рН, доза и время экспозиции.

Именно эти условия определяют место и степень включения МТН в рассматриваемую систему, а также определение функциональной достаточности этого механизма по количеству экспрессированных молекул, уровню их активации,

а также запуска сопряженных циклов, каскадов (например, каспазного для реализации апоптоза).

Значительный прогресс достигнут в идентификации различных внеклеточных, мембранных и внутриклеточных рецепторов, которые являются важными атрибутами для проявления нефротоксичности металлов и, соответственно, выполнения антитоксической функции МТН. Так, например, двухлористая ртуть (сулема) вызывает нефропатию, которая при самых низких эффективных дозах Hg ограничена прежде всего сегментом S3 проксимального канальца, а в более высоких дозах происходит с вовлечением S2 и S1 сегментов. Эта специфичность, по крайней мере, частично, зависит от особенностей индукции соответствующих ферментов и взаимодействия транспортных белков, важных для накопления ртути в клетках проксимальных канальцев, в том числе и прежде всего апикальной γ -глутамилтрансферразы, МТН и базолатеральной транспортной системы органических анионов.

Нуклеарный фактор NF- κ B, плеотропный фактор транскрипции, который обеспечивает выживание клетки и предохраняет ее от апоптоза, требует наличия восстановленных тиолов в ключевые моменты его активации. Ион ртути, известный тиоловый яд, ослабляет активацию и активность транскрипции в нормальных эпителиальных (NRK52E) клетках почек крысы при концентрации 0,5 мкмоль/л, из-за снижения концентрации тиолов, необходимых для активации NF- κ B. Авторы [521] выдвинули гипотезу, что предотвращение активации NF- κ B ионами Hg²⁺ увеличивает чувствительность почечных клеток к иным вызывающим апоптоз токсическим веществам, к которым эти клетки являются устойчивыми при других условиях за счет емкости NF- κ B-активации. Меньше чем 5 % необработанных почечных клеток в культуре оценивались как апоптозные по фрагментации или проточно-цитометрическим профилям ДНК. Обработка Hg²⁺ (5 мкМ) в течение 24 часов увеличивала это количество в 1,5-2 раза. Ни липополисахарид (ЛПС - 1 мкг/мл), ни α -фактор некроза опухоли (TNF- α - 300 мкмоль/мл) — мощные активаторы NF- κ B в почечных клетках — значи-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

тельно не изменяли соотношение апоптозных клеток в основных по сравнению с контрольными группами, которые предварительно не обрабатывались Hg^{2+} . Однако, когда ЛПС или $\text{TNF-}\alpha$ применяли после предварительной экспозиции Hg^{2+} (5 мкмоль/л в течение 30 минут), соотношение клеток, подвергающихся апоптозу, через 22 часа увеличивалось в 4-6-раз по сравнению с контрольной группой. Напротив, предварительная обработка Hg^{2+} не увеличивала количество апоптозных клеток, при действии вызывающих апоптоз агентов, которые не активизируют NF-карраВ (стауроспорин, лиганд Фаса). Эти результаты позволяют предположить, что Hg^{2+} усиливает чувствительность почечных клеток к инициаторам апоптоза, как следствие ингибирования активности NF-карраВ. Поскольку апоптоз, как известно, играет ключевую роль в патогенезе почечной дисфункции, следующей из повреждения токсическим веществом клеток проксимальных канальцев, поддержка апоптоза через ингибирование активности NF-карраВ может определять важный молекулярный механизм, посредством которого реализуется токсичность Hg^{2+} в клетках почек.

Вопросы поглощения металлов в почках из плазмы, где они циркулируют в форме комплексов с лигандами в широких пределах молекулярных масс, фильтруемости, растворимости в липидах и способности к диссоциации, суммированы в обзоре [522]. Особое внимание авторами справедливо уделено известному нефротоксиканту — кадмию. Последний поступает в почки прежде всего в виде комплекса Cd-MTH , который высвобождается в плазму из печени. Хелатные комплексы, подобные ЭДТА, способны ингибировать поглощение Cd из-за настолько сильного связывания металла, что он не может реагировать с мембранами клетки. Перемещение Cd и других металлов из крови непосредственно к почечной паренхиме в присутствии цистеина и других аминокислот токсикологически важно, когда металлы не циркулируют в плазменных комплексах с МТН.

Наиболее полное представление о сложном и многокомпонентном характере поступления, трансформации и удаления кадмия из клеток эпителия проксимальных каналь-

цев почек было наглядно представлено С.С.Bridges и R.K. Zalups [453], из представленных на рис. 32 данных отчетли-

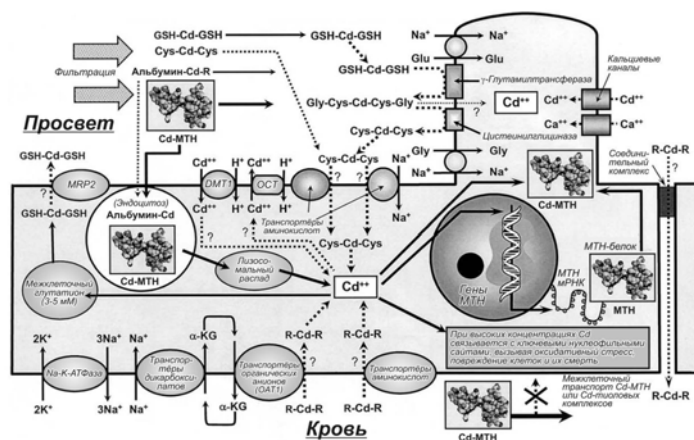


Рис. 32. Поступление, биотрансформация и удаление Cd из клеток эпителия проксимальных канальцев почек [453].

во видно участие МТН в связывании и выведении кадмия из эпителиоцита. Кроме того, прослеживается как минимум три важных особенности этого сложного механизма: 1. участие тиолатов различного происхождения в образовании комплексов, имитирующих эссенциальные метаболиты и способствующие поступлению кадмия в клетку; 2. Использование феномена ионной мимикрии в син-транспорте кадмия через Ca-каналы. 3. Возможность пересечения кадмием границ клетки с участием транспортеров органических анионов, аминокислот и активного транспорта с участием энергии АТФ. Вероятно, этим не исчерпываются возможности кадмия для проявления им нефротоксичности. Указанное еще раз подчеркивает роль экспрессии МТН и образование Cd-MTH комплексов в процессах детоксикации ТМ в почках.

Cd является типичным нефротоксикантом, который циркулирует в крови преимущественно в составе Cd-MTH комплекса, фильтруется клубочками нефрона, реабсорбируется клетками проксимальных канальцев путем эндоцитоза, поддерживаемого специальными рецепторами, поступает в

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

лизосомы и вызывает апоптоз клеток [523].

Транспорт свободного Cd^{2+} в клетку осуществляется разными переносчиками, в том числе транспортерами семейства ZIP SLC39A8 и SLC39A14, котранспортером MDT-1 (DMT-1), осуществляющим обмен Fe^{2+}/H^{+} , а его комплекса с Cd-MTH – мультилигандными рецепторами эндоцитоза – мегалином и кубилином [524]. Обсуждается также роль АТФ-связывающих транспортеров в выведении Cd^{2+} из клеток.

Hammond T.G. [525] определил точные места связывания Cd-MTH с кубилином в почках, что позволило выявить ингибиторы накопления кадмия и предотвращения его нефротоксического действия. Эксперименты показали, что идентификация мест связывания пептида, на которых кубилин связывает МТН и комплексы МТН с тяжелыми металлами, позволит разрабатывать защитные средства от тяжелой клинической нефротоксичности, вызванной металлом. Для этого необходимо в проксимальных канальцах искать ингибиторы связывания комплекса МТН-МТН с кубилином и проверить защитные эффекты пептидов/белков, связывающихся с кубилином при нефропатиях, смоделированных на животных.

Предметом широкой дискуссии является участие MRAP-1 (multidrug resistance-associated protein 1) и трансмембранного регулятора CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) в выведении комплекса Cd-GSH из клеток и/или входа в клетку свободного Cd^{2+} с помощью белка MRAP-1. И, наконец, имеются про- и контраргументы относительно участия Ca-каналов в транспорте Cd. Большинство Ca-каналов N- и L-типа в обычном состоянии находятся в закрытом положении (за исключением каналов типа CaV1.3), что делает нереальным вход значительных количеств Cd с помощью данного механизма в физиологических условиях. С другой стороны, Ca-каналы T-типа пропускают двувалентные ионы Fe и Mn и могут также участвовать в транспорте Cd, также как и TRPM7 (transient receptor potential melastatin-like 7) и митохондриальные Ca-каналы (применительно к поступлению Cd в МХ). Тем не менее, в составе комплекса

Cd-MTH этот нефротоксикант переносится в клетки проксимальных канальцев практически исключительно с помощью механизмов эндоцитоза, которые также включают ряд вспомогательных факторов.

АДФ-рибозилирующий фактор (Arfs) регулирует везикулярный транспорт ионов металла и вовлечен в процесс эндоцитоза. С помощью флуоресцентного метода показано, что ARF6 ассоциирован с плазматической мембраной и включается в процесс эндосомального транспорта вместе с белками Rab5a и Rab11 [526]. В последующем была прослежена роль Arf1 в эндоцитозе трансферрина и MTH-1, а также индуцированной Cd-MTH-1 программированной смерти клеток проксимальных канальцев почек у дикого типа клеток с гиперэкспрессией Arf1 или мутантов с подавлением его синтеза - Arf1-T31N [527]. Захват MTH-1 ARF6-DN-клетками был существенно снижен, а токсичность Cd-MTH-1 ослаблена (14,8 мкМ за 24 ч). Если апоптоз у клеток дикого типа наблюдался в $27,3 \pm 3,9\%$ случаев, то у ARF6-DN-клеток – в $11,1 \pm 4,0\%$ ($n = 6$, $P < 0,02$). Авторы пришли к обоснованному выводу о наличии весомой вспомогательной роли ARF6 в управляемом профильными рецепторами процессе эндоцитоза и транспорта MTH-1 в эндосомы и далее в лизосомы клеток проксимальных канальцев, а также токсичности комплекса Cd-MTH-1 в эпителиоцитах.

В этом же плане большой интерес представляют вышеупомянутые белки семейства Rab [528]. Они представляют внутриклеточные белки – активаторы эндосомального антигена EEA1 (early endosome antigen 1). EEA1 представляет собой внутриклеточный мембранный белок массой 162 кДа. Он выступает в роли антигена ранних эндосом и связывает фосфолипидные везикулы, содержащие фосфатидилинозитол-3-фосфат. Содержит два специальных домена: FYVE- и цинковый пальцевидный домен. Первый отвечает за связывание EEA1 с фосфолипидом, а второй - с белками RAB5 и RAB5-ГТФ. В клетке EEA1 может находиться в цитоплазме, ранних эндосомах или на периферической мембране. Связывание осуществляется за счёт FYVE-домена и приводит к образованию димера, который специфически связывается с

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

фосфатидилинозитол-3-фосфатом. Наличие в молекуле EEA1 второго домена - $C_2H_2Zn_2$ – пальцевидного элемента является чрезвычайно важным в плане его взаимодействия с МТН и осуществления последним регуляторной функции через Zn-донорный механизм.

Комплекс Cd-МТН разрушается лизосомальными гидролазами, что входит в единый механизм защиты клеток от кадмиевой интоксикации. Если разложения комплекса не происходит (при нарушении функционирования лизосом либо поступлении комплекса Cd-МТН в количестве, которое превышает метаболизирующий потенциал лизосом), он становится наиболее значимым токсикантом в клетке, приводя в действие механизмы апоптоза.

Например, культуры клеток почечного эпителия проксимальных канальцев использовались как модель для изучения сравнительной нефротоксичности Cd-МТН и $CdCl_2$ [529]. Изучали *in vitro* влияние $CdCl_2$ и Cd-МТН на поглощение α -метилглюкозы в культуре эпителиальных клеток проксимальных канальцев крыс. 50% ингибирование поглощения α -метилглюкозы происходило при воздействии $CdCl_2$ в концентрации 6 мкМ по сравнению с концентрацией 25 мкМ для Cd-МТН, что свидетельствует о большей токсичности $CdCl_2$, по сравнению с Cd-МТН. Кроме того, поглощение Cd-МТН эпителиальными клетками проксимальных канальцев было намного меньше, чем $CdCl_2$. Испытания, проводимые на клетках линии LLC-PK1, аналогично показали, что 50 %-ая ингибирующая концентрация (IC_{50}) при поглощения альфа-метилглюкозы была 10 мкМ для $CdCl_2$ и 25 мкМ для Cd-МТН. Накопление кадмия в пределах клеток линии LLC-PK1 было в пять раз больше при воздействии $CdCl_2$, чем при введении Cd-МТН. Токсические явления для этого штамма клеток наступали быстрее при воздействии $CdCl_2$ (12 часов), чем при воздействии Cd-МТН (18-24 часа). Проводились эксперименты, исследующие поглощение кадмия апикальными и базолатеральными сторонами клетками линии LLC-PK1 в проксимальном канальце. Базолатеральное введение привело к большему поглощению кадмия, чем при апикальном введении. Токсичность была больше при воздействии $CdCl_2$ в слу-

чае базолатерального введения. Эти результаты находятся в противоречии с результатами многочисленных исследований *in vivo*, которые показывали, что Cd-MTH является более нефротоксичным, чем CdCl₂. Таким образом, сделан вывод, что культура клеток нефроэпителия не является адекватной моделью для изучения нефротоксических последствий введения Cd-MTH *in vivo*.

Тем не менее, проведено множество экспериментов *in vitro* для изучения роли MTH в реализации нефротоксического действия кадмия и ртути. При этом большое количество исследований проводилось на культурах клеток почечного эпителия проксимальных канальцев грызунов. Однако, не так хорошо известно, что организация гена MTH у людей и грызунов весьма различна. Доказано, что у грызунов существует два координационно регулируемых гена MTH: MTH-1 и MTH-2, человек обладает 7 функциональными генами для MTH-1 и одним для MTH-2, ни один из которых не регулируется координационно (рис. 17). Не известно также, важно ли это увеличение количества генов для реакции почек человека на ядовитые вещества или просто представляет собой пример дублирования функции, эволюционно обеспечивающей более высокую стрессоустойчивость организма [530]. В связи с этим неясно, может ли культура клеток грызунов использоваться как достаточная модель для изучения нефротоксичности у человека.

Вызванная Cd токсичность изучалась также при воздействии металла на культуру тубулярных клеток почки человека [531]. В опытах *in vitro* отмечалась фрагментация ДНК и обнаруживался пик активности каспазы-3 при достижении пороговой концентрации Cd. Пороговая концентрация Cd, вызывающая нефротоксичность, составляла 150 мкг/г влажной ткани. Сделан вывод, что механизм выведения кадмия может включать тубулярный некроз и последующее слущивание (эксфолиацию) поврежденных эпителиальных клеток проксимальных канальцев. При этом апоптоз может включаться в стабилизацию вызванной Cd нефротоксичности.

Полученные в опытах *in vitro* данные существенно до-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

полняются и выстраиваются в систему по результатам комплексных исследований *in vivo*. Такие модели считаются наиболее адекватными в плане получения клинически значимой информации.

Уже в ранних исследованиях [532] была изучена зависимость между уровнем МТН в плазме крови экспериментальных животных, экспонированных кадмием, и признаками нефротоксичности. Крысам линии Wistar вводили 5 мкмоль меченого CdCl_2 подкожно по 5 дней в неделю в течение 14 недель. Определяли уровни кадмия в органах и тканях, МТН в печени, почке, плазме и моче, а также экскрецию кадмия с калом и мочой. Было найдено, что примерно 60 % введенной дозы в первые 12 недель опыта содержалось в печени. В последующие 2 недели наблюдалось снижение этого показателя (на 20 %). Такое же положение отмечено в почках, хотя общее содержание кадмия в них было в 10 раз ниже, чем в печени. Следует подчеркнуть, что 80 % металла в печени и 70% в почке было связанным с МТН. Авторы полагают, что снижение содержания в тканях кадмия не связано с понижением связывающей способности МТН. Концентрация кадмия в почках в течение 10 недель опыта нарастала линейно и достигала уровня 220 мкг/г влажной ткани. На этом основании авторы пришли к заключению, что именно почки являются критическим органом по накоплению кадмия в хроническом эксперименте. Причем, наибольшее содержание зафиксировано в корковом слое, где оно превышало 300 мкг/г.

Симптомы кадмиевой интоксикации у лабораторных животных стали отчетливо проявляться через 10 недель опыта в виде глюкозурии и протеинурии. На 14 неделе опыта протеинурия достигла уровня свыше 100 мг белка за 24 часа. Комплекс Cd-МТН четко зафиксирован в плазме через 4 недели опыта с последующим возрастанием. Однако, даже через 10 недель большая его часть была связана с высокомолекулярными белками плазмы, такими как альбумин и глобулин. По окончании эксперимента (14 нед.) с МТН в плазме было связано около 1/3 общего содержания кадмия.

Кадмий выводился из организма преимущественно с калом. Так, через 2 недели опыта с фекалиями выводилось 6,4 % общей дозы с линейным ростом до 10 недель. При этом с фекалиями выводилось 9,7 % введенной дозы с тенденцией к резкому возрастанию в течение 2 последних недель. Общее выведение кадмия из организма за 14 недель составило 22 % введенной дозы. С мочой выводилось в первые 4 недели 0,01 % общей дозы, она удвоилась на 8 неделе, после чего экскреция с мочой резко возросла и в конце 14 недели составляла 7,25 % от вводимой дозы. Содержание МТН в моче коррелировало с содержанием МТН в плазме, и к концу 14 недель Cd-МТН составлял приблизительно 90 процентов металла в моче. Авторы считают, что определение МТН в моче у экспонированных кадмием рабочих может быть более информативным, чем определение β -2-микроглобулина. Одновременно ставится задача разработки более селективного и чувствительного метода определения МТН в биологических жидкостях. И действительно, в последующие годы методическим аспектам проблемы МТН, как было показано выше в разделе 3.7, было уделено приоритетное внимание.

В работе [533] показано, что индуцированная кадмием нефротоксичность развивается при концентрациях кадмия в корковом веществе почки порядка 10-300 мкг/г влажной массы.

Т. Aoyagi et al. [534] изучили вызванную Cd нефротоксичность и систему выведения кадмия у крыс. Самцам крыс линии Спрэйг-Доули подкожно вводили Cd в дозе 0,6 мг/кг в сутки в течение 3, 5 и 8 недель. Концентрацию Cd в моче, сыворотке и почках измеряли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии после выведения животных из эксперимента. Нефротоксичность оценивали по концентрации β -2-микроглобулина в моче и гистологически. Апоптотные клетки выявляли введением меченых атомов, по фрагментации ДНК и активности каспазы-3. Нефротоксичность была обнаружена после 4 недель воздействия Cd, когда в моче появились Cd и β -2-микроглобулин. Концентрация Cd в ткани увеличивалась линейно в течение 8 недель воздействия Cd. Концентрация Cd в почках не изменялась при 3-недель-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ной экспозиции, но снижалась после прекращения введения Cd в группе животных после 5-недельной экспозиции, что предполагает наличие активного механизма выделения Cd, который начинает действовать после 4-ой недели опыта. Пороговая концентрация Cd при проявлении нефротоксичности была 150 мкг/г влажной ткани. Именно при такой концентрации гистологически наблюдалось повреждение тубулярного аппарата. Хотя в поврежденных почках преобладал некроз, но уже на 4 и 5 неделе наблюдался также апоптоз. Он развивалась еще до развития массивного почечного тубулярного некроза и, вероятно, отражал включение адаптационно-компенсаторных механизмов в патогенез интоксикации.

R.A. Goyer et al. [535] подкожно вводили крысам-самцам 0,6 мг Cd /кг/день 5 дней в неделю в течение 2, 4, 6, и 8 недель. По окончании эксперимента печень и почки были исследованы на содержание МТН и кадмия. После 4 недель экспозиции содержание общего кадмия в почках было на уровне 801 ± 25 нмоль/г (89,9 мкг/г), а не связанного с МТН - 390 нмоль/г (43,7 мкг/г). Через 8 недель экспозиции эти показатели составляли 1827 ± 48 нмоль/г (215,3 \pm 5,8 мкг/г) и 628 нмоль/г (70,2 мкг/г) соответственно. Общее содержание кадмия было выше в печени, чем в почках, но их распределение в этих двух органах было существенно различным. Фракция, не связанная с МТН, возрастала со временем экспонирования и в печени, и в почках. Однако общее содержание кадмия в печени не превышало возможности потенциально доступных связывающих сайтов МТН, тогда как общий кадмий фактически превышал потенциально доступные связывающие сайты МТН в почках, где и были обнаружены патологические изменения.

Проведенными одновременно морфологическими исследованиями были выявлены ультраструктурные изменения, которые являются наиболее ранними признаками кадмиевой интоксикации. Так, было выявлено появление белковых образований в цитоплазматических везикулах клеток эпителия проксимальных канальцев. Имело место повреждение митохондрий и увеличение количества микротелец. Авторы считают, что дегенерация клеточных мембран является наибо-

лее ранним клеточным эффектом при экспонировании кадмием, что сопровождается токсическим действием на клеточные органеллы, вызывает некроз клеток и внутритканевый фиброз. Индуцированная кадмием клеточная токсичность определяется в основном несвязанной с МТН фракцией кадмия в почках, а не общим содержанием кадмия в этих органах.

У кролика почечное базолатеральное поглощение Cd в присутствии монотиогликоля лимитировано прохождением через клеточную мембрану. Комплекс Cd-монотиогликоль конкурирует с анионными сайтами, связывающими Cd на мембранах клетки, которые обладают намного более высоким сродством к металлу, чем плазменный белок. Нагрузка Cd приводит к депрессии транспорта аминокислот в почках после определенного периода инициации, когда концентрация кадмия в почечной коре достигает максимальных уровней (в течение 2 часов после инъекции). Обработка хелатными комплексами способна повлиять на изменения, происходящие в течение периода иницирования, но только если такой препарат введен в течение первых нескольких часов после поступления кадмия. Показано, что удаление основной части Cd из почки позже, чем через 2 часа после нагрузки, не предотвращало последующей почечной дисфункции. Это совместимо с представлением, что металл только косвенно изменяет аминокислотный транспорт [536]. Введение Cd вызывает каскад реакций, развитие которых продолжается даже после удаления токсиканта, что подтверждает гипотезу о наличии достаточно мощных механизмов саморазвития металлонефропатий [537].

Подобные исследования были проведены C.G. Elinder et al. [538], которые подкожно вводили CdCl₂ кроликам. Уровень накопления Cd в зависимости от дозы составлял от 13 до 214 мкмоль/кг массы тела. Его содержание в почечной коре составляло от 0,3 до 3,2 ммоль/кг и приводило к экспрессии синтеза МТН в клетках почек. Было определено молярное отношение кадмия, цинка и меди в МТН-фракциях почек с различным содержанием Cd. При низких концентрациях Cd в почках кролика основное количество МТН было

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

связано с Zn (70-90 %). При высоких концентрациях Cd в почках он становился доминирующим металлом в составе МТН, вытесняя из него цинк. Когда на кадмий приходилось 85 % ионов металлов, связанных с МТН-фракциями, а 15 % составлял Zn, наблюдалось появление β_2 -микроглобулина в моче, что относится большинством авторов к классическим признакам нефропатии. Таким образом, патологические проявления кадмиевой интоксикации появляются при недостаточном количестве сайтов, доступных для Cd в МТН. Это еще раз подчеркивает важность МТН для защиты организма от вызываемой Cd нефропатии.

Поскольку одним из ведущих механизмов в патогенезе металлонефропатии является реализация конкуретных соотношений между эссенциальными и токсичными металлами, представляет интерес влияние на этот показатель поступления в эффекторную зону других ионов. В качестве объекта наблюдения была использована система транспорта *l*-аминогиппуриновой кислоты через базолатеральную мембрану проксимальных S_2 сегментов канальца неперфузированной почки кролика [539]. Введение Cd^{2+} приводило к увеличению уровня *l*-аминогиппуриновой кислоты, а добавление ионов других двухвалентных металлов (Zn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+}) давало неоднозначные результаты. Добавление Ni^{2+} или Zn^{2+} к омывающему раствору приводило к значительному сокращению базолатерального транспорта *l*-аминогиппуриновой кислоты, тогда как Co^{2+} был не в состоянии замедлять ее накопление. Одновременная инкубация с тромбином (10^{-9} М), который, как известно, увеличивает концентрацию $[Ca^{2+}]$, ликвидировала последствия воздействия двухвалентных ионов. Эти результаты показывают, что Ni^{2+} и Zn^{2+} восстанавливают клеточное накопление *l*-аминогиппуриновой кислоты. Поскольку Ni^{2+} и Zn^{2+} являются блокаторами кальциевых каналов, они, вероятно, взаимодействуют со связывающими сайтами в кальциевом канале, вызывая сокращение концентрации $[Ca^{2+}]$, тогда как Co^{2+} не воздействует на эти связывающие сайты.

$HgCl_2$ широко используется для экспериментального моделирования острой почечной недостаточности («сулемо-

вая почка») [540]. Было предпринято морфометрическое исследование для изучения влияния двух сублетальных доз ($T_1 = 1$ мг/кг и $T_2 = 3,5$ мг/кг) $HgCl_2$ в проксимальных канальцах крыс. Проводили количественное определение эндоплазматических и ядерных превращений в эпителиоцитах контрольных и подопытных животных. У первых наблюдались единичные повреждения клеток, а изменения в ядрышках отсутствовали. $HgCl_2$ вызывал прогрессивно нарастающую атрофию проксимальных канальцев. В группе T_1 , некроз был ограничен клетками прямого канальца, в которых наблюдалась частичная сегрегация ядрышек. В группе T_2 атрофия была особенно обширна в извитых и прямых канальцах, ядрышко было полностью сегрегировано и преобразовано в видимые под микроскопом скрученные включения. Ультраструктурный анализ подтвердил появление дозозависимых изменений проксимальных канальцев, имели место некроз, апоптоз, сегрегация ядрышек, набухание митохондрий, вакуолизация. Таким образом, в почке крысы $HgCl_2$ вызывала дозозависимые изменения не только в цитоплазме, но также и в ядрах клеток проксимальных канальцев. A. Stacchiotti et al. считают [541], что эти результаты помогут лучше понять патогенез нефротоксичности ртути.

Не меньший интерес представляют данные о различии в патогенетических механизмах действия свободного ТМ и его комплекса с МТН [542]. Показательным в плане моделирования реальных условий контаминации организма является экспонирование неорганическими соединениями Cd и его комплексом с МТН. Именно инъекции комплекса Cd-металлотионеин (Cd-МТН) приводят к выраженному повреждению почек. Для понимания механизмов Cd-МТН-индуцируемой нефротоксичности было исследовано интратенальное распределение ^{109}Cd -МТН. Для этого ^{109}Cd -МТН, выделенный из печени крысы, был введен мышам в дозе 0,1 мг Cd/кг, внутривенно. Радиоактивность в почке достигала максимального уровня (85 % дозы) уже через 30 минут после однократного введения и оставалась постоянной до 7 дней после инъекции. ^{109}Cd в основном находился в коре почки. Световая микроскопическая ауторадиография почки показала, что в

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

пределах коры ^{109}Cd распределен избирательно в S1 и S2 сегментах проксимальных канальцев. В пределах S1 и S2 сегментов, концентрация ^{109}Cd в основных и апикальных частях клеток была сопоставима после нефротоксической дозы CdMTN, а после нефротоксической дозы (0,3 мг Cd/кг) радиоактивность была избирательно распределена в апикальной части клеток. Напротив, исследование методом световой микроскопической ауторадиографии, показало, что ^{109}Cd при введении $^{109}\text{CdCl}_2$ был более равномерно распределен по проксимальным канальцам. Кроме того, после воздействия большой дозы неорганического Cd (3.0 мг Cd/кг), подобная концентрация Cd была найдена в извитых и прямых проксимальных канальцах. Эти данные подтверждают гипотезу, что нефротоксичность, индуцируемая Cd-MTN, объясняется, по крайней мере частично, предпочтительным поглощением Cd-MTN в S1 и S2 сегментах проксимальных канальцев.

Ранним проявлением нефротоксичности Cd является кальцийурия [543], возникающая спустя несколько часов после инъекции Cd-MTN крысам. Защита против кальцийурии и протеинурии (которая наблюдается позже) достигается предварительной низкодозовой обработкой Cd, который вызывает синтез MTN. В эксперименте одной группе животных предварительно вводили CdCl_2 , чтобы вызвать синтез MTN. Группу сравнения оставляли без предварительной обработки. Распределение Cd при обычной нефротоксической дозе $^{109}\text{CdMTN}$ было изучено гель-хроматографией в субклеточных фракциях почечной коры в обеих группах. В первой группе животных (которым предварительно вводили кадмий), ^{109}Cd в плазматической мембране и микросомальных фракциях клеток коры почек был главным образом связан с MTN и другими низкомолекулярными белками через 4 часа. Во второй (необработанной) группе животных основная часть ^{109}Cd была связана с высокомолекулярными белками. Эти результаты указывают, что мембранные белки могут быть важными мишенями для Cd и что связывание Cd с MTN (а, вероятно, и с другими низкомолекулярными белками) может быть механизмом защиты

Показано [544], что введение Cd-MTH вызывало кальцийурию, что может свидетельствовать о нарушенном транспорте кальция через почечный трубчатый эпителий. Почки выделяли у крыс через 4, 12 и 24 часа после однократной инъекции Cd-MTH (0,4 мг Cd/кг массы тела). Контрольной группе вводили физраствор. Скорость фильтрации определяли по поступлению $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в базолатеральных мембранных пузырьках, выделенных из почечной коры, с использованием последовательной процедуры ультрацентрифугирования. Показано, что ингибированию кальциевого базолатерального насоса предшествует стадия связывания. Насос нормально поставляет Ca^{2+} внутрь клетки. Если выведение его нарушается, наблюдается рост уровня внутриклеточного кальция, достигающий четырехкратного значения в нормальной почечной коре через 24 часа.

В принципе, можно предположить, что существуют взаимодействия между медью, цинком, и кадмием, которые влияют на токсичность Cd *in vivo*. В работах [545, 546] изучали распределение этих металлов в печени и корковом веществе почки и их выделение с мочой. Шестьдесят крыс-самцов Вистар были разделены на 10 групп. Вводили подкожно цинк (0 или 25 мг/кг массы тела), медь (0 или 12,5 мг/кг) и Cd-MTH (0,1 или 0,4 мг Cd/кг). Крысам вводили цинк и/или медь за 24 часа до инъекции Cd-MTH. После инъекции Cd-MTH уровень задержания Cd заметно снижался в корковом веществе почки и увеличивался в печени при предварительной обработке медью, в то время как у этих крыс выделение Cd с мочой было значительно ниже. Уровни эндогенного цинка в корковом веществе почки и печени увеличились значительно у крыс, которым предварительно вводили медь. Синтез MTH в печени и корковом веществе почки индуцировался более эффективно медью, чем цинком.

Концентрации Ca^{2+} и белка в моче и Ca^{2+} в корковом веществе почки использовали как маркеры нефротоксичности. Множественный регрессионный анализ показал, что для большой дозы Cd-MTH увеличенные значения белка в моче, вызванные инъекцией Cd-MTH, более эффективно уменьшались цинком, чем медью, и чрезмерная концентрация Ca в

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

моче и корковом веществе почки, вызываемая Cd в дозе 0,28 мг/кг в виде Cd-МТН, более эффективно может быть уменьшена до нормального уровня медью в дозе 7,98 мг/кг, которая в три раза более эффективна, чем цинк. Полученные результаты могут быть важны в понимании механизма токсичности кадмия и Cd-МТН и потенциального влияния цинка и меди на хроническую нефротоксичность при воздействии кадмия.

Было исследовано распределение цинка, кадмия, ртути и индукции МТН в ткани печени и почек белых мышей-самцов через 24, 48 и 72 часа после введения перорально эквимолярной дозы (15 мкмоль металла/кг) хлоридов цинка (II), кадмия (II) или ртути (II). Наблюдалось умеренное увеличение уровней цинка в печени и почках (главным образом, в их ядерно-митохондриальной фракции — NMF) через 24 часа после воздействия хлорида цинка. В дальнейшем содержание цинка в печени продолжало возрастать, тогда как в почках снижалось. Уровень инициированного цинком МТН в печени был максимальным через 48 часов, и затем немного уменьшался, в то время как не было отмечено никакого увеличения уровня МТН в почках за время наблюдения. Кадмий одинаково распределялся в печени и почках больше в цитозольной фракции (SCF), чем в ядерной митохондриальной фракции через 24 часа после введения дозы хлорида кадмия. Уровни кадмия со временем показали тенденцию к уменьшению в печеночных фракциях и к увеличению в почечных фракциях. Инициированный кадмием рост МТН в печени и почках был значимым через 24 часа после воздействия кадмия, причем печеночный МТН снижался после этого, в то время как почечный МТН рос до 48 часов, а затем снижался.

Накопление ртути в почке было в 1,5 раза больше, чем в печени. Ртуть была локализована больше в цитозольной фракции, чем в ядерно-митохондриальной через 24 часа после введения двуххлористой ртути. Уровни ртути в субклеточных фракциях печени и почек начали уменьшаться после 24 часов и после 72 часов они были значительно ниже.

Индукция МТН в печени и почках была максимальной

через 24 часа после воздействия двухлористой ртути. Количество МТН уменьшалось со снижением уровня ртути. Однако, уровни МТН в обоих органах оставались значительно более высокими, чем у контрольных животных, даже через 72 часа после экспозиции.

Результаты исследования показывают, что накопление металла в печени и почке уменьшается в ряду: ртуть > кадмий > цинк и индукция МТН уменьшается в ряду ртуть > кадмий > цинк в печени и кадмий > ртуть > цинк в почках. Изменения в гомеостазе цинка и меди были отмечены в печени больше, чем в почке, и уменьшались в ряду: ртуть > кадмий > цинк [547].

Эти данные корреспондируются с результатами собственных исследований авторов. При предварительном остром внутривенном введении соли Zn, последующее введение Cd-МТН, выделенного из крысиной печени, в дозе 0,8 мг (Cd)/кг веса тела, для крыс является нефротоксическим, но не летальным. Апикальная везикуляция в эпителиоцитах почечных извитых канальцев проявляется в пределах 1 часа после введения и к 4 часам была значительно выражена в некоторых клетках, которые окружают большие артерии в коре. Мембраны этих клеток кажутся неповрежденными. Поражение развивается со временем; к 24 часам первоначально поврежденные клетки погибают, имеет место обширный некроз, особенно в эпителии извитых трубчатых канальцев. В других регионах коры наблюдались признаки дегенерации. Внутренняя полоса внешней зоны мозгового слоя и других частей нефрона (клубочек, дистальный каналец и собирающийся проток) кажется незатронутой. Некротические изменения максимальны через 48 часов, но после этого начинается регенерация. Электронная микроскопическая автордиография почки после введения ¹⁰⁹Cd-МТН показывает, что Cd не сконцентрирован в эндоцитозных пузырьках, лизосомах, или других клеточных органеллах, даже сразу после введения, но распределен равномерно по эпителиоциту. Таким образом, хотя Cd-МТН поступает в почечные канальцы путем эндоцитоза, кажется, что выделение Cd из металлопротеина должно происходить очень рано в процес-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

се перераспределения [548].

В работе [549] была сделана попытка установить взаимосвязь между дозозависимой нагрузкой кадмием и экспрессией МТН в механизме возникновения почечной дисфункции. Для этого кроликам вводили подкожно кадмий (0,3 мг Cd/кг ежедневно). Через 0, 5, 8, 11, 12, 13 и 14 недель экспозиции определяли показатели функции печени и почек, а также содержание Cd-МТН в плазме крови. Наиболее выраженные изменения обнаружены в период между 12-14 неделями воздействия. При этом установлена корреляция между выраженностью дисфункции печени и почек с изменением концентрации Cd-МТН в плазме. Авторы полагают, что синтезируемый в печени МТН связывает экзогенный кадмий и в металлизированной форме поступает в кровь. При этом имеет место нарушение функционального состояния печени, вызванное токсическим действием кадмия. В то же время почечная дисфункция обусловлена поступлением в проксимальные каналцы металлобелкового комплекса Cd-МТН. Максимум воздействия на почечную паренхиму Cd-МТН наблюдается при уровне последнего 80 мкг Cd/л в плазме. Концентрация Cd-МТН в плазме является информативным биологическим маркером почечной дисфункции, вызванной экспозицией кадмием.

При введении Cd-МТН беременным крысам в дозах 0,25-1,0 мг Cd-МТН /кг массы тела, единственным органом, который непосредственно повреждался Cd-МТН, являлись почки [550]. Это коррелируется с данными предыдущей работы. Все дозы Cd-МТН в диапазоне 0,25-1,0 мг/кг обладали нефротоксическим действием и приводили к длительной анорексии у беременных самок. Накопление Cd в почках крыс, которым внутрибрюшинно вводили Cd-МТН в дозе 0,25 мг/кг, происходило медленнее, чем при более высоких дозах. В то же время, его концентрация через 12 ч экспозиции была более высокой, чем при введении той же дозы внутривенно.

Кратковременная экспозиция CdCl₂ (внутривенное введение) приводила к повреждению печени, в то время как

внутривенное вливание раствора Cd-МТН вызывало нефротоксикоз [551]. В последнем случае имело место быстрое накопление Cd в клетках почечных канальцев, тогда как в печени под воздействием Cd-МТН накапливались лишь незначительные количества Cd. Однократное внутривенное вливание Cd-МТН приводило к накоплению кадмия в почечной ткани. При этом одновременно имели место морфофункциональные изменения в почках, сходные с таковыми при хроническом воздействии неорганического Cd. Парентеральное введение Cd-МТН может быть использовано для моделирования кадмиевого нефротоксикоза, поскольку несколько инъекций Cd-МТН заменяют месяцы введения малых доз неорганических солей кадмия. Нефротоксичность Cd-МТН не зависит от линии (генетической своеобразности) мышей. У них происходило одинаковое накопление Cd и МТН и имели место одинаковые проявления нефротоксичности. При этом Cd-МТН у разных линий вызывал различные деформации печени и тестикулярной ткани [552].

Еще один шаг к пониманию роли МТН-комплексов в нефротоксичности кадмия и ртути был сделан путем изучения относительного распределения их в тканях печени и почках крыс самцов, при введении (внутривенно) неорганических солей или комплексов этих металлов с МТН в дозе 0,3 мг/кг массы тела. Инъекции HgCl₂ и Hg-МТН индуцировали синтез МТН только в почке, тогда как инъекции CdCl₂ и Cd-МТН - и в печени, и в почках. Уровни МТН в плазме крови увеличились спустя 3 дня после инъекции CdCl₂, но не после инъекции HgCl₂. Т.о., предполагается, что печеночный МТН может быть важным источником плазменного МТН. Проявления металлонефропатии у крыс, которым вводили МТН и обе формы ртути, выражались в морфологических изменениях и увеличении в крови азота мочевины, ростом уровня креатинина в плазме, протеинурией. Выделение МТН с мочой было значительно повышено у крыс, которым вводили Cd-МТН, по сравнению с теми, которым вводили CdCl₂. Однако у крыс, которым вводили Hg-МТН и HgCl₂, не было значительного различия в выделении МТН с мочой. Накопление Hg в почках сходно при введении Hg-МТН или HgCl₂, но ло-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

кализация повреждения эпителия отлична. Последствия повреждения Hg-МТН ограничены, главным образом, в предельных частях извитого канальца и начальных частей непосредственного прямого канальца, тогда как неорганическая Hg вызвала некроз *in pars recta segments* проксимального канальца [553].

Таким образом, в этой работе показано, что, несмотря на большое сходство в электронном строении, а также на то, что эти металлы являются мощными индукторами синтеза МТН, действие комплекса ТМ-МТН для этих металлов различно. Возможно, это связано с более прочным связыванием ртути (по сравнению с Cd) в комплекс с МТН.

J. Liu et al. [554] изучали нефротоксичность при совместном введении Cd и мышьяка обычным и 0-МТН-мышам. Мышам вводили $CdCl_2$ с пищей (100 ppm Cd), $NaAsO_2$ (22,5 ppm As) в питьевой воде, или смесь Cd плюс As в течение 4 месяцев. Впоследствии нефротоксичность была исследована морфологическими и биохимическими методами. Хроническая экспозиция Cd была более токсична для почек, чем As, а комбинация Cd и As токсичнее любого из этих химических веществ. Повреждения у 0-МТН мышей были более выражены, особенно при введении комбинации токсикантов, что проявлялось в снижении веса тела, энзимурией, глюкозурией, протеинурией и нефропатией. Таким образом, мышьяк может усиливать нефротоксичность Cd в течение долговременной совместной экспозиции, и внутриклеточный МТН играет роль в уменьшении нефропатии при объединенной экспозиции Cd и As [555].

В работе [556] показано, что в механизм острой токсичности кадмия вовлекаются многие аспекты, включая окислительное повреждение и аберрантную экспрессию гена, причем, отсутствие МТН усиливает индуцированную кадмием аберрантную экспрессию гена.

Введение Cd^{2+} вызывает ингибирование котранспорта Na (+) - глюкозы в корковых клетках почки мыши. Ингибирование наблюдалось не ранее, чем через 3 часа после введения Cd^{2+} . Его величина зависела от концентрации Cd^{2+} и вре-

мени экспозиции. Индукция мРНК МТН иницировалась через 1 час после начала инкубации с Cd^{2+} и достигла максимума через 3-6 часов. Содержание МТН увеличивалось медленнее, начиная с 3 часов экспозиции, и продолжалось до 9 часов. Металлизированный МТН содержал и Cd^{2+} , и Zn^{2+} . Однако, не связанный с МТН Cd^{2+} появился после 3 часов, что совпадало с началом ингибирования котранспорта $Na (+)$ – глюкозы. При этом содержание Cd^{2+} увеличивалось в последующие 9 часов. Предварительная обработка клеток Zn^{2+} защищала их от влияния Cd^{2+} на ко-транспорт $Na (+)$ – глюкоза и задерживала начало ингибирования транспорта, а также рост этого ингибирования. Детальный анализ распределения Cd^{2+} и Zn^{2+} в растворимой фракции тубулярных эпителиоцитов почек клеток показал, что концентрация Cd^{2+} , не связанного с МТН, не зависела от наличия Zn-МТН [557].

Кроме МТН-1 и МТН-2 в проксимальных канальцах нефрона показано также присутствие МТН-3. Экспрессия МТН-3 наблюдается в ответ на стрессорное воздействие избыточными концентрациями кадмия в клетках эпителия проксимальных канальцев почек. При этом МТН-3 обеспечивает осуществление транспортной функции [558].

Исследованиями [559] показано, что рецептором комплекса Cd-МТН в почке является гигантский рецептор-гликопротеид, известный как кубилин (cubilin). Для подтверждения роли связывания МТН с рецептором при поступлении тяжелых металлов в почку нормальным мышам и особям с поврежденным рецептором вводили хлорид кадмия в подострых и острых опытах. Определение точных мест связывания Cd-МТН с рецептором кубилина в почках позволило выявить ингибиторы накопления кадмия и проявления им нефротоксичности.

Таким образом, идентификация мест связывания пептида, на которых кубилин связывает МТН и комплексы МТН с тяжелыми металлами, открывает возможность разрабатывать эффективные защитные средства от клинически выраженной нефротоксичности, вызванной ТМ. Для этого необходимо в проксимальных канальцах искать ингибиторы свя-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

звания комплекса ТМ-МТН с кубилином и детально изучить защитные эффекты пептидов/белков, связывающихся с кубилином при экспериментальных нефропатиях.

Исследования, проведенные R.K.Zalups et al. на крысах с односторонней нефроэктомией, показали компенсаторный рост уровня МТН в сохранившейся почке, по сравнению с крысами, которым была проделана «псевдооперация», т.е. почка не удалялась. У прооперированных крыс предварительная индукция цинком синтеза МТН изменяла концентрацию и локализацию накопленной в почке ртути после инъекции нефротоксичной дозы сулемы. Ртуть накапливалась в коре почки больше, чем в мозговом веществе, а повреждающее действие соединений ртути снижалось, по сравнению с животными без предварительной индукции синтеза МТН.

Таким образом, после нефроэктомии оставшаяся почка по компенсаторному механизму увеличивала синтез МТН за счет процессов транскрипции и трансляции [560]. Эти данные имеют важное значение для понимания молекулярных механизмов компенсаторных процессов в почке, которые формируются на генетической основе и включают сложные пространственно-временные взаимосвязи в ее обеспечивающих протекторные свойства компартаментах. В частности, недостаточность сигнальных функций МТН, вызванная подавлением его синтеза при быстро развивающейся острой почечной недостаточности (ОПН), не оставляет резерва времени для включения геномной компенсации клеток нефрона, способствуя тем самым активации некротических изменений и должно рассматриваться как неблагоприятный прогностический признак.

В работе [561] изучали последствия односторонней нефрэктомии и компенсационного почечного роста на количество МТН в почках. Содержание МТН в почках крыс увеличилось пропорционально увеличению массы в почках после односторонней нефрэктомии и компенсационного почечного роста. У крыс предварительная обработка цинком вызвала синтез МТН прежде всего в корковом веществе почки. Предварительная обработка цинком также изменила струк-

туру внутрипочечного накопления неорганической ртути у крыс после нефрэктомии. После предварительной обработки цинком накопление неорганической ртути преобладало в корковом веществе почки, а не во внешней зоне мозгового слоя почек крыс после нефрэктомии. Авторами сделан вывод, что способность к увеличению синтеза МТН сохраняется значительной у крыс после односторонней нефрэктомии и компенсационного почечного роста. Увеличенная способность остатка почки к синтезу МТН может включать адаптивные изменения и в процессах транскрипции, и в трансляционном контроле синтеза МТН.

В настоящее время исследование содержания МТН в моче людей, подвергшихся воздействию ТМ (кадмия, ртути, меди, цинка и др.), является широко распространенной процедурой [562, 563, 564]. В Японии [565] проведено эпидемиологическое изучение вызванной кадмием почечной дисфункции по уровням МТН в моче. Объектом изучения были 3168 мужчин и женщин старше 50 лет из загрязненной кадмием области и 291 индивидуумов из незагрязненной области. Средние уровни МТН в моче контрольной группы были $138,2 \pm 2,1$ и $198,6 \pm 1,9$ мкг/г креатинина для мужчин и женщин, соответственно. Соответствующие значения для экспонированной кадмием совокупности были соответственно $157,8 \pm 2,2$ и $248,0 \pm 2,2$. Металлотионеинурия была выявлена у 4,6 % мужчин и 8,4 % женщин из загрязненной кадмием области. Распространенность металлотионеинурии увеличивалась с возрастом и длительностью проживания в загрязненной области. Эти результаты позволяют предположить, что металлотионеинурия может использоваться как индикатор почечной дисфункции вследствие экологически обусловленной экспозиции кадмием.

В эпидемиологическом исследовании [566], проведенном в речном бассейне Какегаши (загрязненная Cd область Японии), изучали зависимость между поступающей в организм жителей дозой кадмия (Cd) и возникающей почечной дисфункцией. При этом определяли содержание Cd и МТН в моче. Утренние образцы мочи были собраны у 1397 мужчин и 1713 женщин старше 50 лет. Кроме того, образцы мочи

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

были собраны у контрольной группы, состоящей из 110 мужчин и 130 женщин. Верхние пределы обнаружения МТН в моче у 97,5 % лиц контрольной группы считали безопасной нормой. Линейный регрессионный анализ показал тесную корреляционную связь между дозой Cd и уровнем МТН в моче. В контрольной группе повышенная металлопротеинурия наблюдалась у 1,8 % мужчин и 3,1 % женщин. Эти данные были сопоставлены с концентрациями Cd в моче в перерасчете на содержание креатинина, что составило 4,2 и 4,8 мкг/г креатинина для мужчин и женщин соответственно. Эти значения подобны тем, о которых сообщают исследователи, использующие показатель содержания β -2-микроглобулина в моче как индикатор поражения почек. Они могут быть полезны в установлении биологического порога, т. е., максимально допустимой концентрации содержания Cd в моче в экологически зараженной популяции.

Таким образом, даже с учетом ограниченных возможностей для детального анализа взаимосвязи биосинтеза и метаболизма МТН в условиях развития почечной патологии различного генеза создается достаточно четкое представление о выраженном разноплановом влиянии белков данного семейства на формирование, течение и исходы заболеваний почек, прежде всего химической этиологии. Следует подчеркнуть, что этот феномен в современной нефрологии выходит далеко за пределы понятия «нефротоксичность». Производственно и экологически обусловленный контакт населения с ксенобиотиками, поступление в организм природных токсикантов и многочисленные эндогенные интоксикации первично либо опосредованно вовлекают в патогенез многих заболеваний нефрон, почку и мочевыделительную систему в целом [567]. В основе патогенетических механизмов лежат молекулярные, субклеточные и клеточные изменения метаболизма, структуры и функций почек, которые подробно рассматриваются современной токсикогеномикой, протеомикой и метаболомикой. Накапливается все больше данных о том, что низкомолекулярные белки и нуклеиновые кислоты обеспечивают сигнальную, регулируемую и управляющую роль в токсикодинамике нефропатий [568, 569]. В осу-

ществлении этих функций металлотионеинам по праву принадлежит определяющая роль. Не случайно вот уже более 50 лет проводятся все новые исследования, нередко весьма изящные и препаративные по своему методическому замыслу и технологии осуществления, которые раскрывают все новые аспекты функционирования и сложных взаимосвязей МТН в биосинтетических, энергетических и генетических преобразованиях на клеточном, тканевом и организменном уровнях жизнедеятельности биосистем. Эти исследования, по сути, формируют основополагающие представления новой доказательной нефрологии [570, 571, 572, 573].

Подытоживая достаточно обширную и разнородную информацию о роли МТН в патогенезе нефропатий и почечной недостаточности различного генеза, следует обратить внимание на преобладание в литературе данных, полученных при воздействии на культуру клеток, введение разными путями в организм экспериментальных животных тяжелых металлов, а также клинических данных, построенных, главным образом, на отравлениях Hg и Cd. И это не случайно.

Облигатная нефротоксичность указанных металлов, с одной стороны, во многом обусловлена их уникальной способностью связываться с МТН, образовывать сложные и разнообразные по своей стереохимии и координационным взаимоотношениям тиолатные комплексы, которые по-разному вмешиваются в клеточный метаболизм и приводят к принципиально различным по своей патогенетической значимости результатам. С другой стороны, это связано с двойственным характером выполнения своих многочисленных и полимодальных функций самим МТН, которые характерным образом реализуются, как в процессах защиты нефрона от токсического воздействия, так и в развитии процессов повреждения. Это прослеживается наиболее четко на примере взаимодействия метало-МТН комплексов с лизосомальным аппаратом клеток эпителия проксимальных канальцев почек, где, по сути, определяется формирование патологии по типу лизосомальной болезни почек [574, 575].

Уникальность функций почечного эпителия, наряду с

другими составляющими, определяется его участием в процессах реабсорбции широкого круга соединений и избирательного подраздела обмена обменываемых и экскретируемых составляющих клубочкового филтратата. В этом практически и проявляется детоксикационная функция почек в составе единого гепаторенального комплекса, поэтому рассмотрение взаимосвязи МТН с патологическими процессами в почках не может быть оторвано от первичной стадии его образования, происходящей прежде всего и главным образом в клетках печени.

4.3. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ ПРИ ГЕПАТОТОКСИКОЗАХ

Печень является основным органом-мишенью при действии на организм большинства известных ядов, ксенобиотиков и лекарств. Это обусловлено анатомо-физиологическими особенностями строения, системой кровоснабжения печени, а также выполнением ею основной антитоксической функции в организме человека и животных.

Высокая степень нагрузки печеночных клеток химическими веществами в физиологических и патологических условиях определяет характер реагирования гепатобиллиарной системы, осуществляющей практически все стадии биотрансформации и детоксикации ксенобиотиков от распознавания до элиминации. Осуществлению детоксикационной функции подчинены происходящие в гепатоцитах биохимические реакции, которые обеспечены необходимым набором энергетических средств, мощным биосинтетическим аппаратом, а также высокой адаптивностью функциональных комплексов в ядерном, митохондриальном и микросомальном компартментах практически всех видов печеночных клеток. Следует также подчеркнуть взаимосвязь пищеварительной и антитоксической функций печени, объединенных с гастроинтестинальным и ренальным комплексами. Это дает возможность контролировать поступление в организм ядов ингаляционным и пероральным путем, а также осуществлять интегральные и специфические виды синтеза белков, участвующих в этих процессах. Именно с этих позиций следует рассматри-

вать процесс синтеза МТН в печени.

Ранее многократно указывалось, что именно в печени происходит основной синтез металлотиионеина, именно из печени МТН наиболее удобно выделять, и многие исследования гепатотоксичности различных соединений, в т.ч. металлов, включают в себя изучение концентрации МТН методами протеомики или м-РНК МТН методами геномики.

Взаимосвязь МТН с патологическими процессами в печени и гепатотоксикозами постулируется преимущественным характером биосинтеза МТН в гепатоцитах, осуществлением печенью антитоксической и антиоксидантной функций, в осуществлении которых МТН и эссенциальным металлам (прежде всего цинку) принадлежит важная роль. Картина поражения печени токсичными металлами характеризуется рядом особенностей, которые взаимосвязаны с функциями МТН. Не случайно, при снижении концентрации биодоступного цинка и нарушении синтеза МТН происходит угнетение ряда ферментных систем при экспозиции организма кадмием, ртутью, марганцем и свинцом. Происходит нарушение пигментной, углеводной, белковообразующей функций печени, поражается гепатобиллиарная система, нарушается витаминный обмен, происходит жировая инфильтрация гепатоцитов, увеличение, жировая дегенерация печени и поджелудочной железы [291].

Экспрессия синтеза МТН гепатоцитами индуцируется при действии патогенов, обладающих преимущественно стрессорным, мембранотоксическим и энзимопатическим типами повреждающего действия, а также тиоловыми ядами. Типичные признаки поражения печени, такие как рост активности АЛТ в плазме крови, фрагментация ДНК, снижение уровня восстановленного глутатиона, образование нитрозильных и пероксинитритных радикалов сопровождаются индуцируемой цинком и АФК экспрессией МТН. Этот механизм носит выраженный антитоксический характер, что демонстрируется, в частности, отсутствием защитного эффекта цинка у нокаутных по МТН мышей [576].

J. D. Park [577] на обычных и 0-МТН мышах определяли

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

LD_{50} при введении кадмия, цинка, меди, железа, свинца, ртути и мышьяка. Во время ежедневного подкожного введения увеличивающейся дозы каждого металла, начиная с низкой, нетоксичной дозы, сравнивали LD_{50} каждого металла у обычных и 0-МТн мышей. LD_{50} Cd для обычных мышей был в 6,9-раз выше, чем для 0-МТн мышей. LD_{50} для цинка был в 2,4-раза выше для обычных, чем для 0-МТмышей, и в 1,4-раза выше для меди и мышьяка. LD_{50} для ртути был в 1,3 раза выше для обычных мышей, чем для 0-МТн мышей. Не наблюдалось различий в значении LD_{50} для обычных и 0-МТн мышей при воздействии свинца и железа.

Полученные данные имеют большое значение для выяснения функций МТН в физиологических условиях и при моделировании действия специфичных в разной степени гепатотоксикантов. При этом нагрузка цинком, медью и железом отражает вовлечение МТН в гомеостаз эссенциальных металлов, что особенно важно применительно к цинку, который выполняет структурную и функциональную роль в огромной совокупности макромолекул, в т.ч. более чем в 300 ферментах. Поскольку цинк принимает участие в каталитической активности зависимых от меди ферментов, в том числе имеющих ключевое значение в осуществлении печеночных функций СОД и фосфолипазы С, становится понятной позиция Tapiero H., Tew K.D. [578], согласно которой активность указанных ферментов регулируется МТН. Высказанная гипотеза одновременно представляет интерес в плане уточнения взаимосвязи цинка и меди в составе МТН. Поскольку ион Zn^{2+} относится к категории потенциально стабильных в биологической среде, он не участвует в реакции восстановления и не способен пересекать клеточные мембраны путем пассивной диффузии. Его трансмембранное перемещение нарушается при супрессии синтеза МТН гепатотоксикантами, что подразумевает трансмембранный перенос цинка именно в комплексе с МТН.

Экспозиция клеток печени в культуре и в опытах *in vivo* токсичными металлами хотя и носит стрессорный характер, но далеко не охватывает все виды и многообразие проявлений оксидативного стресса, индуцируемого различными

прооксидантами, включая ионизирующую радиацию, нагрузку липидами, гипероксию, лечение противораковыми средствами и др. Однако во всех этих случаях прослеживается как антиоксидантная роль МТН, так и ее недостаточность при блокировании синтеза этого регуляторного белка.

Процесс включения МТН в защиту от оксидативного стресса носит сложный характер и не всегда прослеживается в опытах *in vitro*. Так, индуцируемое перекисью водорода повреждение клеток в культуре гепатоцитов связано только с уровнем внутриклеточного глутатиона, и не приводит к экспрессии МТН. Добавление цинка не оказывает позитивного эффекта, которое четко прослеживается в опытах *in vivo*. В последнем случае экспрессия МТН является информативным биомаркером степени защиты печеночных клеток при передозировании ацетаминофена.

Подобная картина наблюдается при алкогольных поражениях печени. У мышей в результате 6 месячного получения с водой этилового спирта развивалось поражение печени с типичными биохимическими и гистопатологическими изменениями. Оно сопровождалось снижением уровней МТН и других низкомолекулярных белков (IGF-I, insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1), cyclin D1, HNF-4 α .), ответственных за клеточную пролиферацию. Восстановление регуляторной функции этих белков с одновременным увеличением поступления алиментарного цинка признается необходимым условием профилактики цирротических изменений при заболеваниях печени в результате хронического алкоголизма [579].

Защитная роль МТН при проявлении гепатотоксичности металлсодержащими и неметаллическими ксенобиотиками прослеживается в организмах, находящихся на разных стадиях онтогенеза. Это было продемонстрировано, в частности, при изучении указанного феномена на куриных эмбрионах. На 7-14 день инкубации с введением металлов группы платины (Pt, Pd, Rh) наблюдали существенные изменения в формирующейся ткани печени и головного мозга. Стимуляция синтеза МТН путем предварительного введения поро-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

говых доз платины и цинка на 4-11 день инкубации снижала степень поглощения металлов печенью при сохранении и повышении уровня МТН, а также предотвращала появление других признаков гепатотоксичности [580].

Подобные результаты были получены при экспозиции крыс линии Вистар алиментарным кадмием. После 1 месяца ежедневного введения с пищей 100 мкг неорганического кадмия в печени наблюдали снижение активности ГП, рост активности АЛТ, а также рост экспрессии МТН. Степень последней, по мнению авторов, может иметь прогностическое значение [581]. Цитированная работа представляется важной в плане подтверждения наличия антистрессорной функции МТН даже в случае воздействия относительно специфичными к индукции синтеза данного белка токсикантами. Это направление находит отражение во многих публикациях. В частности, Borges L. P. с соавт. [582] при субхронической экспозиции кадмием Швейцарских крыс-альбиносов в течение 30 дней (10 мкг/кг перорально) обнаружили изменение уровня глюкозы и гликогена в крови, гистологические изменения в печени, повышение активности дегидратазы дельта-аминолевулиновой кислоты и рост МТН в печени. Введение крысам дифенилдиселенита в дозе 5 мкг/кг (перорально) снижало повышенный в результате кадмиевой интоксикации уровень МДА в плазме крови, активность АЛТ, ЛДГ, ГГТ и ЩФ. При этом мощность антиоксидантных систем экспонированных животных и устойчивость к токсическому действию кадмия существенно возрастали, коррелируясь с повышением уровня МТН.

С целью лучшего понимания регуляторной роли МТН в реализации токсичности Cd и формировании системы защиты, исследовали способность каждой из трех типичных клеток печени (парехимальные (ПК), Купфера (КК) и эндотелиальные (ЭК) накапливать Cd после воздействия неорганических или органических форм металла. Кроме того, была исследована относительная способность каждого типа клеток индуцировать экспрессию генов МТН, мРНК и синтез белка (апоМТН). Показано, что эндогенные уровни МТН в КК и ЭК более высоки, чем в ПК. Cd в форме CdCl₂ накапливается

одинаково всеми тремя типами клеток, тогда как Cd-МТН обладает избирательностью по отношению к ПК. Все виды печеночных клеток (ПК, КК, и ЭК) способны к увеличению синтеза МТН в ответ на внутриклеточное введение Cd [583].

Приведенные данные подтверждают наличие отчетливых различий в осуществлении биологических функций МТН при металлотоксикозах печени и поражениях, индуцированных различными неметаллическими стрессорами, в т.ч. вирусными инфекциями [584, 585, 586, 587]. Накапливаемая по данному аспекту проблемы информация корреспондируется с данными об участии МТН в иммунных процессах и реактивности организма в целом, что в значительной мере обеспечивается состоянием биосинтетической функции печени и ее нарушением в результате гепатотоксикоза.

В ряде работ [588, 589] на культуре гепатоцитов сравнивается индукция МТН при воздействии эссенциальных и токсичных металлов, с одной стороны, и стероидных гормонов, с другой. Показано, что в первом случае имеет место рост концентрации МТН в 40 раз по отношению к контролю, а во втором - 5 кратный рост (дексаметазон). При сравнении действующих доз авторы нашли, что индуцирующая способность у стероидов в сотни раз слабее, чем у тяжелых металлов. Такое сравнение само по себе не может быть признано удовлетворительным с общефизиологических позиций, поскольку биологическая роль наблюдаемых феноменов принципиально различна. В первом случае речь идет о метаболических реакциях в системе детоксикации соответствующих гепатотоксикантов, а во втором – об инициальном процессе регуляции клеточного метаболизма стрессорными гормонами. Последние отражают клеточный уровень реакции и не учитывают системных и организменных уровней и механизмов интегрального регулирования антистрессорной нейрогормональной системы [590, 591].

Необходимость системного подхода в изучении участия МТН в сложных патологических и восстановительных реакциях подтверждается его участием в процессах регенерации органов и тканей, в т.ч. печени после частичной гепа-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

тэктомии. Клеточная пролиферация, как показали Oliver J.R. et al. [592], у нокаутных по МТН мышей была существенно ниже в процессе регенерации печени после частичной гепатэктомии (35 % печени удалено), чем у мышей дикого типа. Восстановительные процессы достигали максимума через 48 часов. Интересно также отметить, что клеточная регенерация происходит у половозрелых животных [593] с синхронизацией многоэтапного процесса, включающего инициацию, пролиферацию и восстановление структуры и функций печени, что подтверждает наличие высокого регенеративного потенциала гепатоцитов, обычно находящихся у взрослых особей в неактивном состоянии.

Токсические поражения печени представляют сложное сочетание структурно-функциональных нарушений, происходящих под влиянием нагрузки практически всех печеночных структур химическим агентом, либо возникающими под действием химического стресса метаболическими нарушениями. Чаще всего они проявляются в фазовом изменении активности цитохрома Р450, активации алкогольдегидрогеназы, и глутатион-зависимой антиоксидантной функции печени. Наиболее полно указанные признаки химического стресса прослежены при алкогольной интоксикации [594]. Они сопровождаются снижением уровня внутриклеточного цинка в гепатоцитах и содержания МТН в ткани печени, что в совокупности с вышеперечисленными показателями характеризует алкогольную болезнь печени. Следует напомнить также о важной в этом плане позиции относительно защитной роли цинка и МТН при алкогольном гепатотоксикозе. На клеточном уровне именно цинк выступает ведущим ингибитором индуцируемого алкоголем апоптоза, прежде всего за счет подавления усиливаемого оптимальным соотношением *Fas/FasL* процесса реституции ткани. Цинк поддерживает также интегрированную реакцию кишечника на развивающийся эндотоксикоз (как следствие некротического процесса), а также продукцию в печени индуцируемого эндотоксином α -TNF. Данный эффект цинка не зависит непосредственно от МТН, но последний делает цинк биологически доступным, что имеет принципиальное значение при оксидативном

стрессе. Это определяет превентивную и терапевтическую роль цинка как эффективного активатора АДГ и блокатора оксидативного стресса.

Ранее при использовании трансгенных мышей с повышенной экспрессией МТН было показано, что МТН защищает печень от окислительного повреждения, вызванного этиловым спиртом. Поскольку в физиологических условиях МТН связывает цинк и отдает его при окислительном стрессе, представляло интерес определить роль цинка в защите печени от алкогольного повреждения. Для этого нокаутные по МТН мыши экспонировались трехкратно этанолом 5 г/кг внутривентрикулярно с 12-часовыми интервалами [595]. Сульфат цинка вводили интраперитонеально в дозе 5 мг/кг/день в течение 3 дней до экспозиции этиловым спиртом. Отмечено, что у подопытных мышей концентрации МТН были существенно снижены, что коррелировало с уровнем цинка в печени. Трансгенные мыши не реагировали на введение экзогенного цинка изменением концентрации МТН в печени, что, вероятно, было взаимосвязано с установленными дегенеративными морфологическими изменениями и очаговым некрозом печени у нокаутных по МТН мышей. У мышей дикого типа единственным признаком алкогольного поражения печени был микровезикулярный стеатоз. Этиловый спирт ингибировал антиоксидантные системы печени у нокаутных мышей существенно выше, чем у контрольных, что проявлялось в росте ПОЛ и снижении уровня восстановленного глутатиона в печени.

Обычно повторные острые либо хронические алкогольные и другие интоксикации нередко заканчиваются циррозом печени. Для оценки влияния цинка на индукцию МТН в печени крыс с модельным циррозом [596] животным вводили внутрибрюшинно цинк в разных дозах. Установлено, что в сохраненных участках паренхимы печени введение цинка индуцировало синтез МТН, который выполнял антиоксидантную роль в условиях оксидативного стресса, сопровождавшего цирротический процесс в печени. Авторы считают, что МТН препятствует дальнейшему развитию фиброзного процесса в печени и поддерживает функциональную активность

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

сохранившихся паренхиматозных клеток.

Результаты обширных экспериментальных исследований по изучению влияния различных по своей природе ксенобиотиков на процессы синтеза, содержания и динамику транспорта МТН в органах-мишенях явились основой для постулирования роли данного белка при химических и других поражениях печени у людей. Это нашло отражение в ряде публикаций. Так, в печени маляров, погибших от отравления красками, содержащими кадмий, были обнаружены повышенные уровни МТН от 0,160 до 1,665 мкмоль/г, среднее 0,561 мкмоль/г. При этом установлена прямая корреляционная связь между содержанием кадмия и МТН в печени [597].

У лиц с признаками арсеникоза, вызванного пребыванием в отапливаемых мышьяксодержащим углем помещениях, имели место признаки поражения печени, которые проявлялись в статистически достоверном повышении активности АЛТ в сыворотке крови и пятикратном снижении уровня МТН-1 [598].

Признаки поражения печени могут доминировать при производственно-обусловленных, экскузитных и системных заболеваниях. При этом заинтересованность системы металлотioneина может носить прямой и косвенный характер. К числу относительно немногих прямых взаимосвязей патологии печени с изменением уровня синтеза МТН относится, например, болезнь Вильсона. В патогенезе развития данного заболевания участие МТН определяется тремя взаимосвязанными механизмами. Во-первых, это поддержание гомеостаза меди и цинка в печени, во-вторых, это детоксицирующая функция МТН при нагрузке ТМ (медью), в-третьих, это освобождение цинка для восстановления активности ряда металлопротеинов, участвующих в нормализации параметров обмена меди в ходе интенсивной терапии заболевания. Рост синтеза МТН в печени представляет позитивный в прогностическом отношении показатель в части снижения признаков поражения печени [599].

Уровень МТН в печени существенно изменяется в зависимости от характера питания и предоперационной под-

готовки при заболеваниях печени различной этиологии. Вероятно, в этих случаях индукция либо супрессия МТН является информативным биомаркером состояния антиоксидантной функции печени. При подготовке больных к холецистэктомии с применением обогащенного антиоксидантами питания имело место четырехкратное увеличение мРНК МТН-1а, что, по мнению авторов, свидетельствует о позитивном результате антиоксидантной терапии [600].

Таким образом, приведенные в настоящем подразделе в иллюстративном плане результаты экспериментальных и клинических исследований подтверждают существенную роль белков семейства МТН в патогенезе поражений печени различного генеза. Имеется ряд специфических особенностей, характеризующих взаимосвязь МТН с гепатотоксикозами.

1. Так как основной пул определяемого в организме человека и животных МТН синтезируется в печени, любое патологическое повреждение гепатоцитов проявляется в снижении уровня экспрессии генов мРНК МТН и синтеза соответствующего белка.
2. Поскольку оксидативный стресс является ведущим универсальным механизмом печеночной патологии, а МТН выполняет роль антиоксиданта, реализация действия МТН при гепатотоксикозах носит преимущественно гепатопротекторный характер.
3. При нагрузке организма ТМ, практически независимо от пути поступления, происходит индукция синтеза МТН в печени с одновременным специфическим связыванием и транспортом металло-белкового комплекса в почки и кишечник, выполняющие детоксицирующую функцию.
4. Специфические проявления защитного действия МТН отмечаются при системных заболеваниях, обусловленных нарушением гомеостаза эссенциальных металлов, в частности это имеет место при болезни Вильсона с избыточным накоплением меди в печени. Индукция синтеза МТН в печени при этом заболевании является благо-

приятным прогностическим признаком.

В целом, материалы данного подраздела подтверждают полифункциональный характер действия МТН при различных видах патологии печени.

4.4. МЕТАЛЛОТИОНЕИН И НЕРВНАЯ СИСТЕМА

Одним из наиболее сложных и недостаточно изученных видов специфического действия химических веществ на организм человека и животных является нейротоксичность. Трудности ее изучения обусловлены, прежде всего, биоинформационной, коммуникативной, интегративной, регуляторной и защитной функциями нервной системы, многоуровневым иерархическим характером строения с высокой гетерогенностью и специфичностью многочисленных элементов. В ходе генерирования и передачи нервных сигналов имеет место взаимодействие нескольких эндогенных механизмов, обуславливающих повреждение нервной системы (эндогенизация патологических процессов) [601].

Особую роль в этих процессах играют низкомолекулярные белки, включая и МТН. Они образуют цепи и каскады из большого числа взаимодействующих элементов, позволяющих осуществлять поэтапное управление сложными процессами передачи сигналов от сенсорных образований к соответствующим эффекторам, которые реализуют ответные реакции на разнообразные внешние и эндогенные стимулы.

Как известно [602], клетки головного мозга характеризуются относительно высоким содержанием МТН, хотя гематоэнцефалический барьер надежно защищает структуры ЦНС от поступления многих токсикантов, в том числе и тяжелых металлов. МТН являются главными эндогенными Zn - и Cu-связывающими белками в головном мозгу, обеспечивающими клеточный гомеостаз и участие эссенциальных металлов в многочисленных метаболических и регуляторных процессах в ЦНС. Вероятно, именно особенности строения и уникальные свойства МТН лежат в основе участия белков данного семейства в защите клеток от эндогенного и экзогенно обусловленного стресса, возбуждающего действия интер-

лейкинов, каиновой кислоты, 6,6-аминоникотинамида, ряда фосфолипидов. Велика роль МТН в поддержании гомеостаза эссенциальных металлов, а также в предотвращении развития ряда патологических процессов в ЦНС [603]. Эти функции выполняют преимущественно изоформы МТН-1 и МТН-2, которые в течение длительного времени считали единственными представителями этого семейства низкомолекулярных транспортных белков в нервных клетках. Изоформы МТН-1 и МТН-2 представлены преимущественно наиболее легко и быстро экспрессируемым представителем, МТН-2А, который характеризуется как нейропротекторный высокоэффективный белок, существенный для восстановительных процессов в нервной системе [604].

Вышеизложенное делает понятной ключевую роль семейства металлотioneинов в осуществлении нервной системой физиологических функций и развитии патологических процессов, в том числе и химической (токсической) природы [605].

Большое значение МТН в поддержании гомеостаза эссенциальных металлов в нервной системе четко продемонстрировано, в частности, в исследованиях на нокаутных по МТН-1 и МТН-2 мышах, которые чрезвычайно чувствительны к токсическому действию даже близких к физиологическим концентраций этих ионов. В то же время мыши, способные к гиперэкспрессии данных изоформ, проявляют устойчивость к действию тяжелых металлов [364].

Нейроспецифические эффекты МТН привлекли к себе особое внимание после открытия в 1990 г. его специализированной изоформы МТН-3, синтезируемой, в основном, в клетках головного мозга. Поскольку, в отличие от экспрессируемых практически во всех органах и тканях изоформ МТН-1 и МТН-2, изоформа МТН-3 высоко специфична для ЦНС, предполагают выполнение ею важных нейрофизиологических и нейромодулирующих функций именно в нервных клетках [606]. Для понимания механизмов действия этих белков в мозгу большую помощь оказывают опыты на трансгенных мышах [607]. Комплексные исследования на нокаут-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ных по МТН-1 и МТН-2 мышах и животных с гиперэкспрессией МТН-1 показали, что МТН-1 и МТН-2 выполняют преимущественно антиоксидантную, противовоспалительную и антиапоптозную роль в мозгу. Установлено также, что МТН-3 выполняет в нервной системе иные, прежде всего регуляторные, функции. Он обеспечивает в основном процессы выживания и развития организма, роста нервов и нервных волокон, играет роль модулятора, выполняет и участвует в передаче нейротрансмиссивных сигналов в головном мозгу [608].

Для детального изучения функциональной активности МТН-3 в качестве экспериментальной модели использовали нокаутных по МТН-1 и МТН-2 мышей, подвергнутых ингаляционному воздействию парами ртути в течение 2-х часов. Через 24 ч концентрации ртути в тканях мозга (церебральная кора, мозжечок и гиппокамп) определяли методом холодного пара, а меди и цинка - методом ICP-MS. Пары ртути адсорбируются при ингаляции в легких и легко проникают через гематоэнцефалический барьер. Поэтому симптомы поражения ЦНС возникают уже на первых этапах отравления.

В условиях недостатка МТН-1 и МТН-2 у нокаутных мышей МТН-3 не только связывает Zn и Cu, но и выполняет, в дополнение к основным, и другие нейрофизиологические и нейромодуляторные функции [609]. Ртуть легко связывается с МТН-1 и МТН-2 в нервных клетках и элиминируется из мозга в пределах емкости физиологического комплекса. Ее превышение при продолжающемся поступлении металла либо высоких концентрациях блокирует систему (необратимое связывание). Поэтому ЦНС является одной из главных мишеней при экспозиции Hg, а симптомы отравления со стороны мозговых структур - одними из наиболее ранних.

В каждой из выделенных секций головного мозга нокаутных по МТН-1 и МТН-2 мышей уровни Hg были существенно выше, чем у контрольных мышей (дикого типа). Существенное изменение концентраций Zn и Cu после экспозиции парами Hg отмечали только в мозжечке МТН-0 мышей, что связано с пополнением их пула адаптивного геноза. Связанные с белком металлы определяли в жидких фракциях

выделенных участков мозга методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, объединенной с индуктивносвязанной плазмой и масс-спектрометрией (HPLC/ICP-MS). В мозжечке МТН-1/МТН-2 (0) мышей содержание Hg во фракциях МТН-3 и связывающих Hg высокомолекулярных белков было намного выше, чем у мышей дикого типа. Авторы пришли к заключению, что изоформа МТН-3 вместе с высокомолекулярными белками частично берут на себя транспортные функции отсутствующих изоформ МТН-1 и МТН-2. Причем, высокомолекулярные белки могут скорее повреждаться Hg при недостатке универсальных изоформ МТН.

В других опытах [610] нокаутные по МТН-1/МТН-2 и мыши дикого типа были предварительно экспонированы парами Hg в течение 2-х недель в концентрации 0,1 мг Hg/м³ по 1 ч/день 3 дня в неделю. После этого в течение 11 недель дозу увеличивали до 4,1 мг Hg/м³ по 30 мин/день 3 дня в неделю. Мышей забивали после окончания эксперимента, образцы тканей мозга исследовали на содержание ртути и МТН. Как показали результаты исследования, это воздействие не приводило к выраженным клиническим признакам отравления и снижению массы тела. В то же время хроническое ингаляционное отравление парами ртути эффективно индуцирует синтез МТН в мозгу. Причем, не только МТН-1 и МТН-2, но и МТН-3, хотя и на существенно более низком уровне. У нокаутных по МТН-1 и МТН-2 мышей синтез МТН-3 был сохранен и, в отличие от предыдущих опытов, имело место низкое накопление ртути в мозгу. Уровень общего МТН у контрольных мышей дикого типа возрос на 70 %, в основном, за счет МТН-1 и МТН-2. У нокаутных мышей МТН в мозгу возрос только на 19 %, вероятно, за счет меньшей реактивности генов МТН-3 по отношению к ртути. При этом характер распределения Hg в цитоплазме нейронов и глиальных клеток не изменялся.

Эти исследования представляют большой интерес не только в плане изучения различий в реакциях МТН в клетках ЦНС на экспозицию тяжелым металлом, но и в отношении взаимозаменяемости отдельных изоформ в выполнении антитоксической функции. Вероятно, эта задача решается за

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

счет только частичного подключения МТН-3 в патологических условиях. Возможно также, что распределение ртути и МТН-3 в структурах и клетках мозга не совпадает, что делает экспрессию последнего в антитоксическом отношении малоэффективной.

Проведенными исследованиями показано, что особенно интенсивно МТН-3 и его мРНК экспрессируются в богатых цинком нейронах и астроцитах, преимущественно в сайтах с высокими концентрациями везикулярного цинка в таких отделах ЦНС, как обонятельная луковица, гиппокамп, пириформная кора и миндалины, ствол мозга и спинной мозг. При изучении роли и функциональной активности МТН-3 отчетливо проявляется сложный характер физиологии МТН, поскольку, с одной стороны, МТН-3 является достаточно мощным фактором замедления роста клеток (этому обязано его второе классификационное название - «фактор задержки роста» (growth inhibitory factor), а с другой, – МТН-3 является активным гасителем свободных радикалов с антиоксидантными свойствами. В частности, нейтрализации гидроксильных радикалов придают важное значение при индуцированном МТН-3 замедлении роста нейронов в культуре клеток [611]. Следует подчеркнуть и тот факт, что индукция синтеза самого МТН-3 может происходить по независимому от нагрузки металлами пути.

Сравнительная частота обнаружения изоформ МТН в мозгу: МТН-1 > МТН-3 > МТН-2. Все три изоформы МТН исходно экспрессируются в разных отделах мозга примерно одинаково. Кинетика количественных изменений в процессе развития носит конкурентный характер. Доля мРНК каждой изоформы составляет примерно 0,2 % общего содержания в мозговой ткани. При этом мРНК изоформ МТН-1 и МТН-2 накапливается в разных отделах ЦНС подобно, но не идентично. МТН-1 и МТН-2 повторяют друг друга, т.к. у грызунов они экспрессируются скоординированно и однотипно под влиянием разных индукторов и не проявляют особой специфичности [612]. Эти изоформы, как правило, транскрибируются там, где нет или мало МТН-3, например, в мозжечке.

МТН-3 практически отсутствует в белом веществе мозга, богатом глиальными клетками, тогда как МТН-1 и МТН-2, наоборот. МТН-1 отсутствует в нейронах гиппокампа, а в областях с большим количеством глиальных клеток его много. МТН-1 и МТН-2 присутствуют в астроцитах, но отсутствуют в микроглии и олигодендроцитах. В культуре астроцитов МТН-1 встречается в количествах в 10 раз выше, чем в культуре нейронов. МТН-3 определяется в нейронах, особенно в содержащих цинк секреторирующих везикулах.

Кроме того, МТН-3 экспрессируется в ЦНС в значительных количествах в глутаматергических нейронах. Результаты исследований на трансгенных мышах указывают на его вероятную нейропротекторную роль в мозге, хотя интимные механизмы остаются неизвестными [613].

Нейротоксичность глутамата в мозжечковых нейронах в культуре клеток объясняется чрезмерной активацией глутаматных рецепторов, что приводит к росту концентраций внутриклеточного кальция и NO. Показано, что МТН-3 в концентрациях порядка 0,3-1,0 мкг/мл предотвращает вызванную этими биологически активными молекулами нейротоксичность в дозозависимых соотношениях. МТН-3 не предотвращает вызванное глутаматом повышение внутриклеточного уровня кальция, но значительно снижает индуцированное NO повышенное образование циклического ГМФ.

Показано, что NO вызывает выход связанных и скоординированных с цистеином металлов в молекуле МТН-3, что проявляется в S-(Cys)-нитрозилировании белка. Полученные результаты являются убедительным свидетельством способности МТН-3 снижать патологические уровни NO, предотвращая тем самым вызванную глутаматом и NO нейротоксичность.

Как и в других тканях, МТН в мозгу в физиологических условиях характеризуется полифункциональностью. Он связан с метаболизмом и гомеостазом эссенциальных металлов, восстановительными процессами в генетическом аппарате, в частности, ДНК, ростом и дифференцировкой клеток. В них МТН служит источником цинка для вновь синтезируе-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

мых апоэнзимов либо выступает как регуляторная молекула, участвующая в экспрессии определенных генов. Его дополнительными функциями являются контроль клеточного восстановительного потенциала и гашение свободных радикалов. Такая полимодальность МТН четко прослеживается и при патологии ЦНС (табл. 16).

Таблица 16
Функции МТН в ЦНС в норме и патологии (адаптировано из [614]).

Функции металлотиионеина			
Физиология		Патология	
1.	Поступление и распределение ионов меди и цинка	1.	Усиление свободнорадикального окисления
2.	Регуляция биосинтеза и активности комплекса Zn-МТН	2.	Образование амилоидных агрегатов и неродегенерация
3.	Защита клеток от повреждающего действия свободных радикалов	3.	Нарушение укладки нейрофибрилл
4.	Регуляция экспрессии генов	4.	Усиление апоптоза
5.	Защита клеток от повреждений тяжелыми металлами	5.	Нарушение синаптической передачи нервных импульсов
6.	Компартментализация цинка, поставка Zn-зависимым ферментам и транскрипционным факторам в астроцитах и нейронах	6.	Развитие воспалительных процессов
7.	Удаление ионов тяжелых металлов из клеток, цереброспинальной жидкости, экстрацеллюлярного пространства	7.	Металлонеуротоксикозы
8.	Нейромодуляция глутамат- и ГАМК-эргических рецепторов и передачи сигналов, в первую очередь, в Zn-эргических и МТН-3 экспрессирующих нейронах	8.	Онкогенез в нервной системе

Среди патологических процессов, связанных с нарушением функций МТН в ЦНС, пожалуй, наиболее типичными являются поражения структур головного мозга кадмием и ртутью, приводящие к металлонеуротоксикозам. Это особенно актуально для всестороннего изучения в связи с возрастающими уровнями антропогенного загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами, увеличением вклада электронных и электротехнических изделий в этот процесс, который коррелирует с ростом числа нарушений высших психических функций, поведенческих и нервно-психических расстройств и заболеваний среди различных контингентов людей детского, трудоспособного и пенсионного возраста [615].

Yoshida M. et al. [616] изучали нейроповеденческие эффекты у экспонированных парами ртути МТН-0 и мышей

дикого типа. Беременных мышей обеих линий с первого по 18 день гестации экспонировали парами ртути в концентрации 0,5-0,56 мг/м³ по 6 часов в день. Указанное воздействие вызывало изменение у потомства локомоторной активности в открытом поле и способности к обучению на 12 неделе после рождения. У МТН-0 мышей отмечено существенное снижение общей локомоторной активности у самцов и нарушение обучаемости (пассивного избегания) у самок по сравнению с контролем (мышами дикого типа). Концентрация ртути в мозге новорожденных мышей и в возрасте 12 недель оставались повышенными в обеих группах по сравнению с интактными животными, причем у самок концентрации ртути были выше, чем у самцов. У МТН-0 мышей обнаруженные эффекты зависели от недостатка МТН-1 и МТН-2 в мозгу, которые выполняют универсальную защитную роль в ЦНС [617].

В ряде работ проведен анализ влияния Cd на нервную систему. Клинические проявления воздействия характеризуются увеличением частоты головных болей, головокружением, усилением коленного рефлекса, тремора, дермографизма, нарушением сенсорной и моторной хронаксии. Новорожденные более чувствительны к нейротоксическому действию кадмия. Это, по-видимому, связано с повышенной проницаемостью гематоэнцефалического барьера для кадмия у новорожденных. Кроме того, обнаружено блокирующее действие этого металла на адренергические и холинергические синапсы.

Кадмий оказывает выраженное влияние на обмен ряда микроэлементов, в первую очередь алюминия, меди, железа и олова. Это взаимодействие проявляется на уровне ферментативных процессов, всасывания, накопления и выделения из организма [618, 619]. Холиновый транспорт через гемато-энцефалический барьер и поглощение холина клетками головного мозга ингибировались ионами металлов (Cd на 73±2, Mn на 44±6 %), тогда как Cu и Al на этот процесс не влияли. Связывание ионов металлов с основным белком миелина (МВР) происходило в порядке: Hg > Cu > Zn > Mg > Cd > Co, и не включало Mn, Pb и Ca. Последнее в извест-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ной мере согласуется с включением МТН в процессы связывания и транспорта металлов в ряде отделов ЦНС.

Экспозиция обонятельного эпителия кадмием приводит к индукции МТН в магистральных обонятельных нейронах и перенос металла в нейронах происходит в виде комплекса Cd-МТН. При этом глутатион может взаимодействовать с кадмием прежде, чем металл свяжется с МТН [620].

Влияние кадмия на анализаторные функции подтверждается результатами экспериментальных исследований на препаратах оптического нерва [621]. Стоминутная экспозиция Cd^{2+} в концентрации 200 мкМ снижала электрорхимический потенциал оптического нерва в 2,3 раза по отношению к контролю. Это угнетение не снималось 120 минутной реперфузией раствором, содержащим хелаторы кадмия. Рост экстрацеллюлярного Ca^{2+} до 16 мМ предотвращал ингибирующее действие кадмия. При комбинации Cd^{2+} в концентрации 60 мкМ с экстрацеллюлярным K^+ (30 мМ) наблюдалось угнетение потенциала действия. Полученные данные показывают, что Cd^{2+} ингибирует потенциал- и лигандуправляемые кальциевые каналы, в том числе активируемые Ca^{2+} калиевые каналы и обменники $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$. Кроме того, кадмий оказывает ингибирующее влияние на Ca^{2+} -АТФазу.

Указанные эффекты кадмия проявляются в экстрацеллюлярном пространстве, что подтверждается отсутствием эффекта в данном варианте эксперимента на кальмодулин и тубулин (внутриклеточные белки, связанные с обменом кальция, и чувствительные к действию внутриклеточного кадмия). Обработка препарата ингибитором митохондриального дыхания антимицином А приводила к такому же снижению потенциала действия, как Cd в концентрации 200 мкМ. При этом индуцируемое им снижение потенциала предотвращалось цистеином в концентрации 1 мМ, который защищает митохондрии от повреждения. Последнее служит свидетельством прохождения кадмия через клеточную мембрану. Это подтверждается также электронно-микроскопическими исследованиями, проведенными через 100 мин экспозиции Cd. В

препаратах отмечается изменение ультраструктуры оптического нерва, видны митохондрии с нарушенными кристами и микротрубочками. Такие же изменения в оптическом нерве имели место при экспозиции антимицином А в течение 100 мин. Поскольку вызванные кадмием изменения имели место в окружающих нерв астроцитах, следует признать вероятным образование комплекса Cd-МТН. Процесс связывания с МТН происходит уже после проникновения кадмия в клетку через потенциалуправляемые кальциевые каналы.

Приведенные в качестве иллюстрации опубликованные в последние годы экспериментальные данные о нейротоксичности Hg и Cd являются примером успешного использования современных токсикогеномных и протеомных технологий в междисциплинарной проблеме металлотиионеинов. Новые методические подходы, постановка опыта на трансгенных организмах и линиях клеток *in vitro* позволили также получить принципиально новую информацию о нейротоксичности Hg не только в ее органических, но и неорганических соединениях.

Кадмий, который в течение длительного времени рассматривался исключительно как ксенобиотик, обладающий преимущественно нефротоксическими свойствами, оказался общетоксическим ядом с более широким спектром повреждающего биологического действия. Причем, за последние годы он вошел не только в число нейротоксикантов [622], но и облигатных разрушителей системы оплодотворения, роста и развития [623], эндокринных функций [624]. Cd также нарушает работу биологических часов в организме [625].

Приведенные данные представляют интерес также в плане подтверждения позитивной роли синтезируемого в астроцитах МТН в защите ЦНС от токсичных металлов, а также его участия в предотвращении и восстановлении целостности миелиновой оболочки нервов после патологической демиелинизации [626]. При этом наибольшее значение имеют МТН-1 и МТН-2, экспрессируемые практически во всех отделах головного мозга [627]. Если защита нейронов

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

осуществляется с участием МТН-3, то нейропротекторное и репаративное действия в нейроглии присущи только МТН-1 и МТН-2, которые синтезируются в ответ на действие ТМ и стрессоров другой природы в клетках ЦНС точно так же, как и во многих других органах. Именно эти изоформы МТН, регулирующие гомеостаз цинка, контролируют металлсодержащие транскрипционные факторы, участвующие в биосинтезе данного белка, включая цинк-содержащие пальцевидные белки и р53. Следовательно, индуктивные свойства кадмия и ртути по отношению к МТН реализуются в ЦНС с участием генома астроцитов и глиальных клеток по универсальному механизму.

Позиции МТН-3 существенно отличны от других изоформ данного белка и в генетическом плане. В частности, показано, что специфичные для головного мозга гены МТН-3 экспрессируются в цинк-содержащих нейронах гиппокампа, но полностью отсутствуют в глиальных элементах [628]. Металлотионеины вовлечены как регуляторные молекулы в процесс экспрессии соответствующих генов, гомеостатический контроль клеточного метаболизма металлов, а также процесс адаптации клеток к стрессу. Подчеркивается, что МТН выполняет прежде всего регуляторную роль и влияет на процессы транскрипции, репликации, синтеза белка, метаболизма в клетках, а также широкий круг зависящих от цинка биологических процессов.

Поскольку наличие МТН-3 является обязательным атрибутом для цинксодержащих нейронов гиппокампа, можно предположить его важную нейромодуляторную роль в этих клетках, где он является своеобразной ловушкой и депо для свободного обменяемого цинка. Он может играть определенную патогенетическую роль в условиях повышенного содержания экстрацеллюлярного цинка. При этом он также предотвращает неконтролируемый рост нейронов *in vitro*, а нарушение его регуляторной функции играет важную роль в развитии болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний. Нокаутные по МТН-3 мыши становятся высоко чувствительными к обусловленным каиновой кислотой (нейроцитотоксикант, агонист инотропных глутаматзави-

симых каиновых рецепторов) поражениям нервной системы [629]. Это позволяет предположить важную роль дисрегуляторных сдвигов в функционировании МТН-3 в процессах нейродегенерации.

При острых экспериментальных поражениях головного мозга резко возрастает уровень как мРНК МТН, так и самого белка. Последний нарастает медленнее и остается повышенным в течение более длительного времени, чем фибриллярный кислый белок GFAP, ответственный за структурообразование, межклеточную сигнализацию и митоз астроцитов и глиальных клеток. Это различие в активности и распределении МТН-3 и GFAP является важным элементом механизма восстановления нарушенных заболеванием тканей мозга [630]. Оно определяется не столько их уровнем экспрессии в мозгу, как активностью в реактогенных астроцитах, окружающих очаги синильных агрегатов β -амилоида в нервной ткани, поврежденной болезнью Альцгеймера, первого по частоте нейродегенеративного заболевания у людей старше 60 лет.

И, хотя в профилактике поражений головного мозга экзогенными стрессорами принимают участие многие внутриклеточные белки, металлотиионеины, благодаря своим антирадикальным свойствам и металлорегуляторной функции в клетках ЦНС, в первую очередь, астроцитах, по праву занимают в системе нейропротекции ведущую роль. Это определяется также участием МТН в репаративных процессах на уровне нейронов, астроцитов и регенерации аксонов нервных клеток. Во-первых, экстрацеллюлярный МТН обязательно присутствует в жидких средах пораженного заболевания головного мозга; во-вторых, был идентифицирован рецептор мегалин, который взаимосвязан с транспортом МТН в нейронах; в третьих, было непосредственно показано, что в опытах *in vitro* имеет место переход МТН из астроцитов в нейроны; и, в-четвертых, продемонстрирована быстрая интернизация МТН клетками ретиноидных ганглиев *in vivo*, где МТН выступает мощным промотером аксональной регенерации оптического нерва. Именно таким образом была доказана возможность и целесообразность применения МТН

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

при заболеваниях и токсических поражениях ЦНС как мощного терапевтического средства [631].

Это корреспондируется с современной концепцией терапии широкого круга нервных заболеваний. В частности, возникающие у взрослого населения нейродегенеративные болезни (НДЗ) включают гетерогенную группу неврологических нарушений, характеризующихся прогрессирующим, зависимым от возраста снижением нейронной функции и потерей отдельных популяций нейронов. Изменения синаптической функции и аксональных коммуникаций представляют ранние и ключевые патогенные изменения при развитии НДЗ. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе этих нарушений, остаются неизученными.

Большие размеры и сложная архитектура субклеточных компартментов нейронов делает их исключительно чувствительными к изменениям аксонального транспорта. Такого рода нарушения зарегистрированы при большинстве нейродегенеративных процессов, и есть предположение [632], что они занимают важное место в патогенезе заболеваний, хотя и развиваются по разным сценариям. В частности, важная патогенетическая роль отводится дисферропатиям. Авторы считают, что профилактика аксональной и синаптической дисфункций является новым перспективным направлением в лечении большинства НДЗ.

Полученные данные открывают потенциальную возможность управления патогенезом нейродегенеративных повреждений ЦНС путем введения экзогенного МТН-3. Они также подтверждают важную роль МТН в активации глиальных клеток (в частности, астроцитов), как одного из ведущих механизмов осуществляемой этим белком нейропротекции [633]. Скорее всего, он реализует свое действие как сигнальный элемент для многокомпонентного рецепторного комплекса, известного как нейротрофический фактор (GDNF). Последний относится к активно изучаемому в последние годы семейству встроенных в поверхностную мембрану клеток молекул гликозилфосфатидинозитола. Внеклеточный МТН взаимодействует с комплексом GDNF и обеспечивает тро-

фическую функцию глиальных клеток. Эта функция существенно снижается при пониженной экспрессии МТН [634], что может иметь определенное отношение к патогенезу нервно-психических расстройств, (особенно в свете описанной взаимосвязи МТН с аутизмом и другими видами морфофункциональных нарушений ЦНС [635]).

Среди весьма многочисленных разновидностей синдрома аутизма (который в настоящее время рассматривается рядом исследователей как самостоятельная нозологическая форма), наиболее актуальным является ранний детский аутизм (Autism Spectrum Disorder, ASD). Он характеризуется отставанием формирования речевых навыков, проблемами в общении и наличием набора стереотипных привычек. За последние 20 лет количество случаев детского аутизма во всем мире существенно возросло. В США 1 случай аутизма приходится в среднем на 250 детей, причем мальчики страдают аутизмом в 4 раза чаще, чем девочки. Прогрессивный рост аутизма невозможно объяснить только генетическими мутациями, социальными факторами или воспитанием. Необходимо дальнейший поиск маркеров, способов лечения и коррекции этих состояний. В этом плане тяжелые металлы (а отсюда, естественно, и МТН) в последнее десятилетие привлекают внимание исследователей. Так, появилось предположение, что аутизм могут вызывать низкие дозы соединения ртути (тимеросал), которое вводилось в вакцины в качестве консерванта. Несмотря на то, что токсикологические исследования показали безопасность этого препарата, массовое движение родителей в ряде стран Западной Европы привело к отказу от использования тимеросала около 10 лет назад, однако количество аутичных детей в этих странах не только не уменьшилось, но даже возросло.

В докладе W.Walsh и A.Usman в 2002 г. [636] отмечалось, что, возможно, именно дефектное функционирование белков МТН может представлять первичную причину аутизма. Эта гипотеза была выдвинута W.Walsh, который возглавляет Исследовательский центр Пфейфера в Иллинойсе (США). Он проделал биохимические тесты 500 пациентам, страдающим аутизмом, и выяснил, что эти дети имеют не-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

нормальное соотношение меди и цинка (слишком большое количество меди и слишком маленькое количество цинка), контроль за которыми в организме осуществляется МТН.

Проблема участия МТН в физиологических и патологических процессах в ЦНС у людей разного возраста представляет большой интерес для возрастной биологии и медицины. В этом плане особо значимыми являются проблемы нейрофизиологии и биохимии старения, поскольку ожидается, что в развитых странах к 2050 году в возрасте более 60 лет будет до 20 % всего населения [637]. Это существенно повышает риск развития нейродегенеративных заболеваний ЦНС, что подтверждается, например, наличием признаков болезни Альцгеймера у 5,3 млн. жителей США, число которых по прогнозам достигнет 8 млн. к 2030 г. [638].

Хотя за последние десятилетия с помощью стандартных анатомических, иммуногистохимических и биохимических методов были сделаны значительные успехи в понимании старения мозга, многие аспекты биологических основ снижения по мере старения познавательных процессов не нейродегенеративного генеза остаются недостаточно изученными. Это частично определяется техническими ограничениями традиционных подходов, с помощью которых может быть оценена одновременно только небольшая часть нейробиологически значимых соответствующих белков, мРНК или метаболитов. С развитием и внедрением протеомных технологий, которые позволяют одновременную дать количественную оценку сотен тысяч белков, нейропротеомные исследования старения мозга и снижения познавательного процесса становятся все более широко распространенными. В частности, в своем обзоре Kim S.I et al. [639] сосредотачивается на вкладе нейропротеомных исследований в развитие нашего понимания возрастных изменений зависимого от гиппокампа пространственного обучения и памяти, а также изучение патогенеза нейродегенеративных заболеваний у пожилых людей.

Накопление результатов нейропротеомных исследований показывает, что имеет место «гиппокампальное старе-

ние», которое вовлекает в этот процесс такие общие категории, как дисрегуляция метаболизма, рост оксидативного стресса, изменения синтеза белка и снижение синаптической функции. Кроме того, растет число данных, позволяющих предположить, что снижение активности познавательных процессов не представляет нового фенотипа “старшего возраста”, а скорее связано с определенными изменениями нейропротеомики мозга, которые происходят в дополнение к общим возрастным изменениям. Понимание того, происходят ли и как развиваются возрастные изменения в гиппокампальном нейропротеоме, способствуют объяснению механизмов нарушения когнитивных процессов, которые является ключевыми мишенями для повреждающих экзогенных и эндогенных факторов в геронтологической практике, и встречаются у 60% данного контингента, не уступая по значимости таким распространенным видам патологии, как артериальная гипертензия, болезни сердца и диабет 2-го типа [638]. В молекулярных механизмах развития возрастных изменений головного мозга, в первую очередь, его гиппокампальной области, нарушениям биосинтеза и функционирования МТН принадлежит важная роль.

Для понимания взаимоотношений между этими процессами и биологическим старением необходимой является идентификация чувствительных к окислению белков, которые модулируют использование энергии и появление АФК [640]. С этих позиций должна быть рассмотрена окислительная модификация регулирующего гомеостаз кальция белка - кальмодулина, а также функциональная активность характерного для сарко/эндоплазматического ретикулума фермента - Са-АТФазы. Они непосредственно связаны с нарушением баланса между пополнением пула внутриклеточного АТФ путем окислительного фосфорилирования и его утилизацией в клетке, а также с ассоциированным с энергетикой процессом образования АФК.

Снижение уровня генерирования АФК за счет экспрессии МТН, наоборот, будет минимизировать окисление белка и способствовать укреплению восстановительных и разрушающих свободные радикалы систем, которые одновременно

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

обеспечивают элиминацию поврежденных и частично не подвергнутых фолдингу белков. Поскольку эти величины коррелируются с интенсивностью процесса агрегации белка, протекающего с участием Cu и Zn, можно предположить наличие сигнально-регуляторной взаимосвязи между МТН с кальмодулином и Са-АТФазой, т.е. гомеостазом Са в клетке. Возрастные изменения уровня продукции АФК и/или снижение активности антиоксидантных систем представляют важный механизм повышения окислительной нагрузки на нервные клетки, который лежит в основе роста концентрации окисленных белков и непосредственно связан с образованием амилоида в нервной системе.

Получение полного представления о самосборке белка в амилоидные фибриллы представляется проблемой большой важности [641]. Детальное раскрытие механизмов, лежащих в основе неполного фолдинга белка в процессе самосборки в стратегическом плане, позволит решить задачи уточнения патогенеза широкого круга нейродегенеративных поражений. В плане углубления наших знаний по отдельным элементам проблемы необходимо изучить причины возникновения гетерогенности в синтезируемых амилоидных волокнах и такого нередко наблюдаемого в этих случаях явления, как раздел фаз.

В последние годы при изучении структурных и молекулярных механизмов формирования амилоидных фибрилл было обращено внимание на β_2 -микроглобулин, который образует амилоидные отложения в тканях при гемодиализе (диализ-зависимый амилоидоз). В кислой среде *in vitro* β_2 -микроглобулин быстро образует ассоциаты амилоидоподобных фибрилл с разнообразными морфологическими свойствами, сохраняющие при этом β -микроструктуру. Были обнаружены частично свернутые и несвернутые участки и молекулы, изучена кинетика и термодинамика процесса, что представляет интерес для характеристики наблюдаемых в организме амилоидных нарушений и раскрытия механизмов самосборки белков для решения задач протеомики в целом.

Поскольку β_2 -микроглобулин является низкомолекуляр-

ным белком, участвующим в амилоидообразовании, он является объектом интенсивных исследований в этом направлении. С использованием обширного набора физико-химических методов были получены важные для медицинской химии и токсикологии данные [642], согласно которым амилоидные фибриллы представляют главную, доминирующую в структуре белка цепь с водородными связями и оптимальной упаковкой аминокислотных остатков. Возможны различные конформации белка даже в условиях преобладания или наличия одной доминирующей цепи и ее роста, что делает достаточно легким образования амилоидной конформации. Последнее не согласуется с устоявшимися представлениями об этом процессе и вселяет оптимизм в раскрытие важных в клиническом отношении механизмов амилоидогенеза. Роль, место и время подключения МТН в предотвращение развития сценария патогенного амилоидоза требует дальнейших исследований.

Формирование нерастворимых амилоидных отложений белка в тканях лежит в основе развития более 40 различных заболеваний человека, многие из которых являются тяжелыми хроническими недугами, часто приводящими к фатальным для пациента исходам. Особую актуальность в современной патологии нервной системы представляют дегенеративные заболевания (такие, как болезни Альцгеймера, Паркинсона, амиотрофический склероз и др.), которые поражают не только лиц преклонного возраста, но и значительный контингент работающего населения. За последние годы накопилось достаточно много информации, свидетельствующей о вовлечении МТН в патогенез указанных видов патологии, а также данные касательно вероятных механизмов, лежащих в основе ее развития.

МТН-3 является ингибитором неуправляемых нейротрофических процессов при болезни Альцгеймера. В тканях мозга больных нейродегенеративными заболеваниями уровень его экспрессии существенно снижается, причем одновременно возрастает синтез GFAP в реактогенных астроцитах. Кислый фибриллярный глиальный белок GFAP (glial fibrillary acidic protein) образует волокна длиной 8-9 нм в

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

сформировавшихся неповрежденных астроцитах в ЦНС и является объектом интенсивных исследований в последнее десятилетие [643]. Он является представителем семейства белков цитоскелета, обеспечивает стабильность структуры клеток и играет важную роль в модуляции подвижности астроцитов. В ЦНС высших позвоночных вследствие различного рода функциональных нарушений, вызванных травматическим повреждением, заболеванием, генетическими расстройствами или химическим воздействием, астроциты активируются, их реактивность возрастает по типичному сценарию, известному как астроцитоз [644]. Он характеризуется быстрым повышением синтеза GFAP, ростом содержания белка либо связыванием с антителами к GFAP. При этом имеет место супрессия синтеза МТН с нарушением его нейродинамических эффектов и регуляторной функции.

По поводу дизрегуляции и роли МТН-3 при болезни Альцгеймера (AD) имеются крайне противоречивые данные. Поэтому М.С. Amoueux et al. [645] изучили содержание этой изоформы МТН в темпоральной, фронтальной коре, гиппокампе и мозжечке у больных AD и представителей двух контрольных групп. Для количественного определения мРНК МТН-3 в сравнении с мРНК β -актина, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГА-3-ФДГ), рибосомной РНК18S (гРНК 18S) была использована обратная ПЦР. Распределение МТН-3 соответствовало таковому для мРНК. Оно было высоким как у больных, так и у представителей контрольных групп. Однако это не означает, что содержание мРНК МТН-3 находится на постоянном уровне. Оно меняется под действием факторов, не относящихся к патогенезу AD. Другими словами, уровень мРНК МТН-3 в мозгу пациентов с болезнью Альцгеймера практически не изменялся, тогда как мРНК BDNF была поражена в результате заболевания.

Нарушение регуляции выделенного из мозга нейротрофического фактора (BDNF) происходит на ранних стадиях прогрессирования AD в коре головного мозга. Так как BDNF играет ключевую роль в выживании нейронов, пластичности синапсов и памяти, снижение содержания BDNF может сказываться на функциональной активности ЦНС больных, а

также способствовать отмиранию клеток и синапсов, приводя к характерному для AD дефициту памяти. В опытах *in vitro* показано [646], что β -амилоид ($A\beta$) способствует нарушению регуляции BDNF, но образования специфичных агрегатов $A\beta$ и проявлений дисрегуляции *in vivo* не установлено. При исследовании коркового уровня BDNF мРНК на трех различных моделях (трансгенные мыши), обнаружены скрытые мутации в белке-предшественнике $A\beta$ (β -amiloid precursor protein – APP), результатом чего является гиперпродукция $A\beta$ на мышинной генетической модели синдрома Дауна. Две из трех трансгенных по $A\beta$ линии [(APP(NLh) и TgCRND8)] показали существенное снижение мРНК кортикального BDNF, по сравнению с мышами дикого типа, хотя ни животные третьей линии (APP(swe)/PS-1), ни мыши модели синдрома Дауна (Ts65Dn) не проявляли признаков поражения ЦНС. Только мыши линий APP(NLh) и TgCRND8 показали высокий уровень экспрессии $A\beta$ и высокие значения соотношения $A\beta$ (42)/ $A\beta$ (40), а также большие значения SDS-устойчивых олигомеров $A\beta$ (примерно 115 кДа). Мыши линии TgCRND8 характеризовались нарушением регуляции транскриптов III и IV BDNF; регуляция транскрипта IV была также нарушена при AD. Более того, у представителей трансгенных мышей всех линий отмечена корреляция между уровнем больших олигомеров, $A\beta$ (42)/ $A\beta$ (40), и уровнем снижения BDNF. Полученные результаты также позволяют предположить, что эффект $A\beta$ по снижению экспрессии BDNF является специфичным для состояния агрегации $A\beta$ и зависит от содержания больших олигомеров.

Все вышеизложенное показывает, что при болезни Альцгеймера имеют место сложные взаимоотношения между экспрессией мРНК, синтезом различных изоформ МТН в клетках головного мозга, что указывает на поливалентность выполняемых этим белком функций в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Сама реализация этих функций предполагает включение разных механизмов, участие многочисленных активирующих и ингибирующих факторов, которые могут нарушаться при стрессорных воздействиях. Ответственные за эти нарушения полипептиды не имеют

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

характерной (особой) аминокислотной последовательности или конформации [647]. Некоторые из этих белков и пептидов характеризуются главным образом отсутствием упорядоченной структуры. В качестве примеров можно привести такие хорошо изученные физиологически активные белки, как амилин, β -амилоид, $\alpha\beta$ -кристаллин и α -синуклеин.

Так, например, белок теплового шока (sHsp) $\alpha\beta$ -кристаллин ($\alpha\beta$ -Crist) локализован вместе с α -синуклеином (α -Syn) в тельцах Леви – патологических маркерах болезни Паркинсона. Он является ингибитором образования амилоидных фибрилл α -Syn *in vitro* независимым от АТФ путем. Ингибиторная роль $\alpha\beta$ -Crist проявляется в его способности связываться с молекулами α -Syn вдоль образовавшихся фибрилл, препятствуя кинетике удлинения фибрилл. Авторы [648] считают, что этот механизм лежит в основе действия некоторых шаперонов по защите клеточных белков головного мозга от нарушения фолдинга и образования амилоидных агрегатов. В этих условиях МТН-3 может выступать как шаперон, обеспечивая активным цинком процессы фолдинга белка и предотвращая образование аномальных фибриллярных образований.

Напротив, многие другие амилоидогенные белки являются глобулярными в нативном виде. Они имеют строго очерченную третичную структуру (укладку) и способны поддерживать ее в физиологических условиях. Эта группа включает β_2 -микроглобулин, транстиретин, лизоцим, СОД 1 и иммуноглобулины. Большинство глобулярных белков хорошо растворимы в биологических жидкостях. Однако в опытах *in vitro*, в условиях частичного или полного нарушения третичной структуры, они становятся патологически значимыми и вместе с целым рядом других глобулярных белков образуют амилоидные агрегаты и фибриллы. Другими словами, и в условиях организма они могут участвовать в формировании β -центров на уже имеющихся фибриллах путем специфического межмолекулярного взаимодействия [649]. т.е. включаться в патогенез нейродегенеративных и других связанных с амилоидозом заболеваний. При этом ранее защищенные участки становятся поражаемыми, а процесс самосборки

агрегатов – неуправляемой цепной реакцией.

Содержание МТН-3 существенно снижается при болезни Альцгеймера. Для выявления зависимых от возраста изменений уровня экспрессии МТН-3 и его индукции в ответ на оксидативный стресс проведен анализ экспрессии МТН-3 и его мРНК в мозге экспонированных липополисахаридом крыс [650]. С возрастом отмечался существенный рост базальной экспрессии МТН-3 во фронтальной коре, но при этом воздействие LPS не приводило к индукции синтеза мРНК МТН-3 в мозге старых животных. Число иммунопозитивных к МТН-3 клеток возрастало во фронтальной, париетальной и пириформной коре, гипоталамусе и миндалевидном ядре. Отмечалась также индукция синтеза МТН-3 в ответ на LPS в головном мозгу молодых, взрослых, но не старых крыс, преимущественно в олигодендроцитах и микроглии. Другими словами, показано, что индуцибельность МТН-3 в мозгу с возрастом снижается вместе с его антиоксидантными свойствами, что может иметь отношение к развитию нейродегенеративных процессов в нервной системе [651].

Правомерность данной концепции аргументируется не только клиническими и экспериментальными данными об участии МТН и, в частности, его изоформы МТН-3 в защите нервных клеток от нарушения процессов фолдинга белков при болезни Альцгеймера, но и его участием в реализации других протекторных систем. В частности, это касается роли МТН-3 в регуляции функциональной активности дофаминэргических рецепторов [652, 653]. Если при болезни Альцгеймера преимущественно нарушается укладка глобул белков (например, β_2 -микроглобулина) с образованием β -амилоидного белка, то основным компонентом внутриклеточных телец Леви в дофаминэргических нейронах черной субстанции мозга является α -синуклеин. Именно этому белку принадлежит ключевая роль в образовании внутриклеточных агрегатов (включений) при болезни Паркинсона (БП). Длительные эффекты таких переходных металлов, как медь и железо, приводят к дисбалансу окислительно-восстановительных процессов в дофаминэргических нейронах, их гибели и развитию БП.

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

По данным различных исследователей распространенность болезни Паркинсона (БП) в мире колеблется от 65,6 до 187 случаев и в среднем составляет 100 случаев на 100000 человек [654]. Распространенность БП увеличивается после 50 лет и достигает наибольшей величины в возрасте 70-79 лет (до 300-1800 на 100000 населения) [655]. Среди больных незначительно преобладают мужчины (57%) [656]. Частота случаев БП среди населения Западной Европы и Америки колеблется в среднем в пределах 1% населения. Общей тенденцией в наиболее крупных странах является увеличение за последние десятилетия общего количества больных паркинсонизмом. Особенно высока заболеваемость среди лиц пожилого возраста, которая достигает 1,5-2% и даже 5% [657]. По данным ВОЗ, в 90-е годы в мире более 4 млн. человек страдали БП. С дальнейшим ростом в общей популяции удельного веса старших возрастных групп и совершенствованием диагностических возможностей число больных паркинсонизмом будет увеличиваться. Ожидается, что к 2040 г. частота БП увеличится в 4 раза [658]. Медленный, но неуклонно продолжающийся рост заболеваемости, все еще недостаточная эффективность лечения, погрешное течение, а также тяжелая инвалидизация, наступающая у большинства больных - все это превращает паркинсонизм в серьезную социальную проблему.

Концепция о роли оксидативного стресса в патохимических механизмах нейронального повреждения при БП определяет один из путей патогенетической терапии антиоксидантами. Вместе с тем оценка долгосрочного нейропротекторного эффекта антиоксидантов затруднена в связи с отсутствием объективных нейрофизиологических маркеров прогрессирования заболевания [659, 660]. Таким информативным биомаркером может служить МТН. Одной из функций этого белка в различных отделах нервной системы является проявление им выраженных антиоксидантных свойств. Он препятствует стимулированию процессов образования избыточного количества свободных радикалов при повышении уровня железа и меди в мозгу, росту скорости перексидации липидов и активности гемоксигеназы-I при болезни

Альцгеймера.

Отличием оксидативного стресса при БП является не только его более локализованная индукция в черной субстанции, но и появление характерных маркеров для этого заболевания, таких как акролеин, 4-гидрокси-транс-2-нонил, 4-окси-транс-2-нонил и 4-оксо-транс-2-гексинал, веществ с достоверно установленными нейротоксическими свойствами [661]. Последние реализуются, главным образом, через образование свободных радикалов, обладающих прооксидантными свойствами. Оксидативный стресс играет важнейшую роль в механизмах дегенерации дофаминергических нейронов черной субстанции [662]. Многочисленные экспериментальные и посмертные исследования мозга больных БП свидетельствуют об избирательной чувствительности nigральных нейронов к оксидативному стрессу [663]. Нейроны в этой области содержат в высокой концентрации дофамин, нейромеланин и ионы железа. В процессе окисления дофамина, в том числе под действием монооксидазы типа Б (MAO В) образуются потенциальные нейротоксичные свободные радикалы, оказывающие повреждающие действие на структуру клетки.

Подтверждением достоверности этой гипотезы является доказательство защитной роли антиоксидантов, среди которых аскорбиновая кислота, альфа-токоферол, восстановленный глутатион, флавоноиды и Zn-MTH.

Эти данные коррелируются с вышеупомянутыми экспериментальными исследованиями G. Meloni, M. Valbк [652], которые показали, что действие комплекса Zn-MTH-3 существенно снижает опасный уровень восстановительной активности дофаминергических нейронов путем связывания и удаления Cu (II) из комплекса α -синуклеин-Cu (II) с образованием молекулы Cu (I)-Zn-MTH-3, в котором присутствует необычно устойчивый к кислороду Cu (I)-тиолатный кластер. Этот феномен может быть использован при разработке новых стратегий терапии БП с учетом достижений бионеорганической химии.

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Приведенными данными далеко не исчерпывается поток информации об участии МТН в защите нервных клеток от нейротоксических агентов и оксидативного стресса в различных разделах ЦНС, приводящих к нейродегенеративным и другим нарушениям. В целом, описанные в настоящем разделе данные свидетельствуют о важной физиологической роли и полифункциональной активности МТН в нормально функционирующем мозге человека и млекопитающих. Она проявляется в осуществлении жизненноважных гомеостатических и регуляторных функций, обусловленных спецификой обеспечения клеток эссенциальными металлами (цинк, медь), а также участием в окислительно-восстановительных процессах в нейронах, астроцитах и различных по своим функциональным свойствам глиальных клетках. Вероятно, именно это обстоятельство лежит в основе общепризнанного положения о взаимосвязи нарушений функционирования МТН в нервной системе с патогенезом многих опасных видов нервных заболеваний, в первую очередь нейродегенеративного характера. Эти патологические процессы протекают с необратимыми изменениями метаболизма, приводящими к гибели нейронов и других клеток в различных отделах головного мозга, что является предметом интенсивных экспериментальных и патологоанатомических исследований в последнее десятилетие. Роль МТН в этих процессах остается недостаточно изученной и привлекает к себе внимание исследователей.

4.5. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ И АПОПТОЗ

Многофункциональный характер действия МТН в клетке и внеклеточных биосистемах в норме и патологии, на эмбриональном, постнатальном этапах онтогенеза, в развивающемся, взрослом и стареющем организме ставит перед исследователями вопрос об их участии в жизнедеятельности клетки на разных этапах ее существования, от образования до гибели. По справедливому заключению М. Aschner, A.K. West [664], белки семейства МТН вовлечены в ход регуляции экспрессии генов, контроль гомеостаза ТМ в клетках,

клеточной адаптации к стрессу. Они участвуют в процессах транскрипции, репликации, синтеза белков, различных аспектах клеточного метаболизма и большом количестве других, преимущественно зависящих от Zn, биологических процессах. Как удачно определили А.Е. Nielsen et al. [665], жизненный цикл клетки представляет баланс между жизнью и смертью, в котором МТН принадлежит важная и многоплановая роль.

Картина закономерно прослеживаемых стадий жизненного цикла клетки (размножение, дифференциация и развитие, функционирование в зрелом состоянии, старение и смерть) продолжает усложняться по мере раскрытия новых механизмов, их участников и условий протекания многокомпонентного процесса жизнедеятельности. Практически любое воздействие или превышающий пороги восприятия сигнал вызывают ответную реакцию клетки, органов и тканей, организма в целом. Реакция на острые либо повторные / продолжительные воздействия может принимать цепной характер, заканчиваться адаптацией (восстановлением нарушенных функций - *restitutio ad integrum*), переходом на новый уровень реагирования, компенсацией за счет альтернативных путей и механизмов, хронизацией в форме хронических отравлений, заболеваний различной этиологии либо смертью [666]. Практически на каждой из этих фаз или вероятных этапов имеет место гибель клеток, которая реализуется по одному из трех самостоятельных, четко различающихся, но в то же время взаимосвязанных путей или форм: апоптоз, аутофагия, некроз (рис. 33) [667]. Все они, в той или иной мере, прямо или косвенно, связаны также с МТН. И хотя такая взаимосвязь для апоптоза является наиболее общепризнанной, учитывая общие исходные позиции, мы посчитали необходимым дать краткую характеристику всех перечисленных выше видов клеточной смерти.

Некроз или патологическая смерть клетки представляет полное и необратимое прекращение жизнедеятельности, наступающее внезапно, охватывающее практически одномоментно клеточные сообщества и участки тканей. Возникает под влиянием чрезвычайных экзогенных либо эндо-

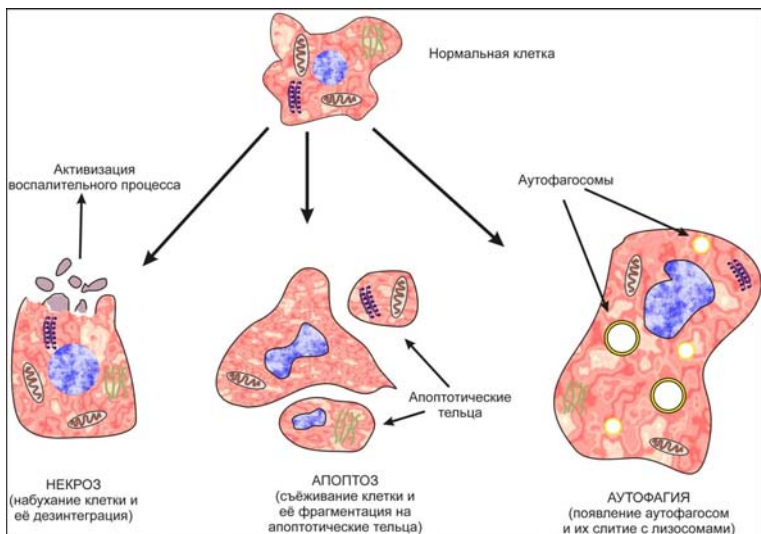


Рис. 33. Три вида клеточной смерти.

генных стимулов, превосходящих по силе и времени воздействия физиологические сигналы, потоки вещества и энергии [668]. Чаще всего некроз связан с нарушением целостности клеточной (плазматической) мембраны, изменениями в цитоплазме клеток, ионном и осмотическом гомеостазе и заканчивается разрушением клетки путем ее лизиса. Происходящие при этом биохимические процессы не нуждаются в притоке энергии, а морфологические изменения, особенно в ядре, в генетическом аппарате клетки, развиваются достаточно медленно. Некроз - это, как правило, массивный некробиотический процесс, который характеризуется не только существенным массопереносом в результате цитолиза, но и мощными потоками сигналов, информации, которая лежит в основе развития воспаления в зоне поражения. Клетки и ткани теряют способность к биосинтетическому метаболизму, росту, развитию, движению и репродукции, т.е. всем атрибутам жизнедеятельности.

Понятие некроза применительно к клеткам, и лежащим в основе некробиотического процесса механизмам, как справедливо отмечают О.О. Фільченков и Р.С. Стойка [667], оста-

ется противоречивым, поскольку в патологии этот процесс рассматривается в соответствующих тканях преимущественно и практически уже после факта гибели клеток. Тем не менее, такая номенклатура принята в специальной литературе и имеет прямое отношение к проблеме металлотионейнов и их причастности к процессам клеточной смерти.

Попытки поиска функциональной взаимосвязи МТН с некробиозом приводят, как правило, к закислению цитоплазмы клеток (уже за минуты после смерти рН падает с 7,2 до 6,8), ее вакуолизации, накоплению жирных кислот, фрагментации белков цитоплазмы лизосомального генеза, появлению клеточного детрита, росту осмотического давления, а на тканевом уровне – развитию признаков воспаления, которое является атрибутом начальных стадий некробиоза. Появление в зонах некротических изменений провоспалительных интерлейкинов коррелируется с одновременной индукцией МТН. Изоформы МТН-1 и МТН-2 быстро и интенсивно экспрессируются под действием цитокинов. Как показали Itoh N. и Kimura T. [669], тому имеется несколько убедительных доказательств:

1. Экспрессия таких цитокинов, как 1-IL- a1, IL-6, и TNF- a, в ответ на введение липополисахаридов в культуру МТН-дефицитных макрофагов существенно снижается по отношению к культуре клеток дикого типа.
2. У этих же клеток снижается зависимость от TNF- a продукция окиси азота,
3. экспрессия Zn-зависимого M-CSF у МТН-дефицитных фибробластов (по сравнению с клетками дикого типа) в культуре супрессирована и существенно повышается у МТН-гиперэкспрессированных фибробластов по отношению к контрольным клеткам.
4. LIF-активирующий STAT3-цитокин, защищает сердечную мышцу от ишемии, вызванной реперфузией сердца.

Трансгенные мыши с гиперэкспрессией STAT3 были толерантны к индуцированной реперфузией ишемии и соответствующим повреждениям сердечной мышцы, тогда как МТН-0 мутанты не проявляли таких признаков. Авторы счи-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

тают, что МТН защищает клетки и организм от разных видов стресса после его экспрессии цитокинами и, одновременно, утверждают о наличии признаков модуляции процесса экспрессии цитокинов металлотиионеинами.

Подобные взаимоотношения могут существенно влиять как на индукцию некротических процессов в клетках и тканях, так и приводить к замедлению и даже предотвращать их развитие. Это подтверждается и имеющимися клиническими наблюдениями. У пациентов с острым инфарктом миокарда (типичный некротический процесс) нарушается регуляция обмена глюкозы, происходит выброс провоспалительных цитокинов, которые не только влияют на процесс образования инсулина в островковых клетках поджелудочной железы, но и повышают уровень мРНК играющего антиоксидантную роль МТН [670]. Данная позиция определяется участием МТН в процессах гашения активных форм кислорода, подавлении оксидативного стресса и поддержании гомеостаза Zn, биодоступность которого влияет на развитие и выраженность воспалительных реакций, в частности, при старении организма. Так, E. Mariani et al. [671], у 38 здоровых лиц в возрасте 60-83 лет изучали обратимость воспалительных реакций по показателям активности NK (природных киллеров), уровней провоспалительных факторов IL-6 и MCP-1 в зависимости от +647 МТН1а и -174 IL-6 полиморфных аллелей, а также купирования наблюдаемых сдвигов указанных показателей после введения аспартата Zn. Интерактивный ответ у лиц с полиморфными аллелями МТН1а и IL-6 генов на Zn, IL-6, MCP-1 и NK активность после дополнительного введения Zn, свидетельствует о генетически обусловленном характере реагирования при осуществлении регуляторной роли МТН в этом процессе.

Наиболее четко подобные изменения прослеживаются при воздействии металлов, характеризующихся повышенной афинностью к МТН. Так, L.J. Lochт [672] исследовали клеточную сигнализацию и поражение клеток – макрофагов, выросших на серебряной поверхности – в течение 3-24 ч. Методом аутометаллографии изучали локализацию Ag в клетках после захвата его цитоплазмой через 1, 3, 12 и 24 ч

воздействия. Через 12 ч клетки наполнялись Ag с появлением S-Ag нанокристаллов. Локализация Ag отмечена преимущественно в лизосомах. Апоптоз индуцировался через 12-24 ч. Одновременно были обнаружены некротические клетки. Экспрессия TNF- α и m-CSF генов повышалась через 3 ч. Противовоспалительный IL-10 снижался через 24 ч с одновременной экспрессией генов iNOS-2 и MTH-1/MTH-2. Т.о., серебро индуцировало провоспалительный эффект клеток, апоптоз и некроз, а также снижение жизнеспособности макрофагов.

Ранее P.J. Sciavolino и J. Vilcek [673] сравнили регуляцию гена MTH-2A цитокинами α -TNF и β -IFN в фибробластах человека. Оба цитокина индуцировали быстро мРНК MTH-2, но стимуляция, вызванная TNF, была более устойчивой. Действие ингибитора синтеза белка циклогексамида снижало стимулирующий эффект TNF на экспрессию мРНК MTH-2, но повышало таковой у бета- IFN. Это указывает на разные механизмы стимулирующего действия изучаемых цитокинов на индукцию синтеза MTH-2. Оба цитокина также кооперативно индуцировали мРНК MTH-2 в клетках линии HeLa. Другие факторы (например, AP-1) оказались неэффективными. Следовательно, существует определенная специфика взаимодействия MTH и цитокинов, вероятно, в том числе и по отношению к некробиозу клеток.

Таким образом, некротические процессы, а также предшествующие им воспалительные реакции в тканях, в известной мере коррелируются с базальным уровнем и экспрессией MTH, который является медиатором образования и поступления в ткани и клетки-мишени широкого круга цитокинов. Он обеспечивает клетки биодоступным Zn и тиоловыми группами, тем самым защищая их от оксидативного стресса, воспаления и последующего некроза. Однако наиболее четко и последовательно такая взаимосвязь прослеживается в случаях программируемых видов клеточной смерти.

Апоптоз (программированная смерть клеток) - регулируемый физиологический процесс в клеточных биологи-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ческих системах, находящихся на разных уровнях эволюционной филогенетически и онтогенетически обусловленной организации, который является ответственным за различные функции, такие как рост и развитие эмбриона, пролиферация и биотрансформация клеток, поддержание клеточного гомеостаза путем самоликвидации стареющих, поврежденных и патологически измененных клеток, обеспечивая слаженную работу нервной, гормональной, иммунной, детоксикационной и выделительной систем [674, 675].

Накоплено огромное количество физиологических, клинических и экспериментальных данных по не снижающей с годами своей актуальности проблеме апоптоза. Имеется ряд ставших классическими и альтернативных схем апоптоза, рассмотрение которых выходит далеко за пределы задач данного обзора. Тем не менее, с учетом наличия тесной взаимосвязи программируемой клеточной смерти с тяжелыми металлами и, вероятно хотя бы частично, в том числе и в этой связи, с металлотиионеином, необходимо обозначить в наиболее общем плане основные современные позиции, характеризующие апоптоз и место МТН в его развитии.

Исходной позицией в данном изложении нами принята работа H.Servais et al. [676], которая рассматривает клеточные механизмы *in vitro* на модели клеток почек линии LLC-PK1 при экспозиции гентамицином [677], многие детали механизма действия которого близки к таковым при экспозиции тяжелыми металлами [678]. В частности, гентамицин так же, как и ТМ, накапливается в клетках проксимальных канальцев почек и вызывает их апоптоз. В основе повреждения лежит дестабилизация лизосом с последующими изменениями митохондрий, известными как митохондриальный путь (механизм) развития апоптоза. Перераспределение вводимого в клетки акридинового оранжевого из лизосом в цитоплазму, изменение митохондриальной пробы с JC-1 и выход цитохрома С из МХ в цитоплазму, активация каспазы-9, фрагментация клеточного ядра одновременно с ростом активности каспазы-3 – таковы основные признаки действия гентамицина на клетки почек в культуре. Следует подчеркнуть важную деталь, что апоптоз наблюдался при концент-

рациях гентамицина до 3 мМ, при которых некроз отсутствует. Скорее речь идет о сигнале к запуску апоптоза, чем его патологическом развитии, тем более что в литературе есть указания на ключевую роль лизосом в индукции апоптоза гентамицином в тубулярных клетках почек *in vivo*, а также преимущественном накоплении этого антибиотика в лизосомах клеток проксимальных канальцев почек [679]. Показаны прямые свидетельства существенной дестабилизации лизосомальных мембран по реакции с акридиновым оранжевым. Как слабое органическое основание акридиновый оранжевый накапливается в лизосомах клеток. Появление зеленого цвета свидетельствует о нарушении градиента рН между лизосомами и цитоплазмой, а, следовательно, нестабильности лизосомальных мембран. В культуре фибробластов таких изменений не обнаружено. Подобная релокализация акридинового оранжевого имела место при действии таких разрушителей целостности лизосомальной мембраны, как 1-лейцил-L-1-лейциновый метиловый эфир [680], MSDH, а также дигитонина, α -токоферил-сукцината, сфингозина [681], солей желчных кислот, которые легко и прочно соединяются с лизосомальными мембранами.

Индукторами апоптоза также являются оксидативный стресс, фотооксидация и H_2O_2 [682]. В данной работе наблюдали активацию лизосомальных нарушений через 2 ч, тогда как митохондриальных – через 10 ч. Авторы считают, что существует лизосомально-митохондриальное взаимодействие в клетке, которое и лежит в основе активации митохондриального пути апоптоза через лизосомы [683], хотя и не исключают прямого действия гентамицина на митохондрии. Таким образом, на примере различного рода индукторов апоптоза показано, что зависимый от каспаз и митохондриальный пути развития программируемой клеточной смерти тесно взаимосвязаны между собой и управляются низкомолекулярными белками на стадиях сигнализации, инициации и локализации процессов, в которых прослежено участие и МТН.

Как и другие тонко отрегулированные клеточные процессы, апоптоз характеризуется рядом отличительных мор-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

фологических особенностей и наличием четкой биохимической последовательности метаболических реакций, складывающихся в их каскады. Идентифицированы многие из белков, играющих важную роль в протекании апоптоза. Однако, молекулярные механизмы апоптоза, индукции и супрессии компонентов соответствующих каскадов, как и их генетическое представительство, остаются недостаточно изученными.

Взаимосвязь МТН с процессами программируемой гибели клеток прослеживается по-разному в дозо- и время-эффектных реакциях и характеризуется выраженной органной и клеточной специфичностью. Это проявляется как в выборе наиболее демонстративного инструмента (действующего на данный вид клеток-мишеней индуктора апоптоза), так и определении наиболее информативных участников реализации соответствующих программ.

Поступающий из производственных и экологических источников Cd хорошо изучен как облигатный нефротоксикант, вызывающий генерализованную дисфункцию проксимальных канальцев почек [684]. Трансмембранный гликопротеин Kim-1, который в норме не определяется в почках, поступает в мочу уже на ранних стадиях индуцированного Cd тубулоинтерстициального поражения почек. Для установления взаимосвязи между экспозицией Cd и гибелью клеток путем некроза либо апоптоза крысам-самцам линии Спрэйг-Дуули вводили подкожно в течение 12 недель по 5 дней в неделю 0,6 мг (5,36 мкМ) Cd/кг [685]. Пробы мочи исследовали на присутствие Kim-1 и энзиматических маркеров гибели клеток (ЛДГ и альфа-глутатион-S-трансферазы (α -GST)). Кроме того, некротические клетки метили специфически путем перфузии почек гомодимером этидия. В биоптических криопрепаратах почек осуществляли визуализацию Kim-1 иммунофлуоресцентным методом, а апоптозные клетки – TUNEL меткой [686, 687]. Детектируемые количества Kim-1 начали появляться в моче на 6-й неделе экспозиции Cd, тогда как общий белок в моче, активность α -GST и ЛДГ не повышались до 8-12 недель. Результаты иммунофлуоресцентного анализа показали, что через 6 и 12 недель опыта в эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек экспрессировался

Kim-1, тогда как число некротических клеток не возрастало и только имело место умеренное нарастание апоптозных клеток через 12 недели опыта. При этом в зависимости от уровня индуцируемой Cd экспрессии МТН, изменялся показатель устойчивости организма к кадмиевой интоксикации, что проявляется, во-первых, в степени выраженности апоптоза, и, во-вторых, в сроках развития некротических поражений канальцев почек.

Нами подробно описаны детали цитированного выше экспериментального исследования, поскольку они существенно отличаются по срокам наблюдаемых сдвигов от результатов наших исследований [55]. Протеинурия (в первую очередь альбуминурия) является ранним признаком экспозиции тяжелыми металлами (в т.ч. кадмием) в дозах на порядок и более низких по отношению к использованным в цитированной выше работе. Обычно протеинурия имеет место уже на 3 сутки после введения кадмия. Что касается использованных биохимических маркеров, ЛДГ и ГСТ, то индукция их активности является признаком гипоксии и оксидативного стресса в клетках, которые как правило, не заканчиваются их гибелью. Обнаруженные авторами признаки некроза в почках через 8-12 недель непрерывной экспозиции кадмием являются признаками не туболоинтерстициальной нефропатии, а хронической почечной недостаточности.

Поскольку апоптоз представляет не только опасный, но и исключительно важный заключительный этап в жизнедеятельности клетки (справедливо сравниваемый по своей значимости с клеточным делением – митозом), в его протекании задействовано много факторов. Они, с одной стороны, обеспечивают сигнализацию о необходимости запуска этого многостадийного процесса, затем последовательное протекание стадий апоптоза, а с другой, регулируют частоту такого рода событий, его тип и конкретное, зависимое от соответствующих условий, предпочтение именно данного вида клеточной смерти, а не равновероятных других (аутофагии либо некроза). Тем более, что каждый из них, как подчеркивается большинством авторов [688, 689, 690], характеризуется выраженной спецификой.

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Таблица 17

Сравнительная характеристика апоптоза и некроза клеток

Апоптоз	Некроз
Биохимические признаки	
<ul style="list-style-type: none"> - Энергозависимый процесс, требует активации; - Раннее расщепление ДНК; - Специфическое («прицельное») расщепление ДНК до олигонуклеотидов; 	<ul style="list-style-type: none"> - Не требует затрат энергии, протекает пассивно; - Постлитическая фрагментация ДНК; - Случайное расщепление ДНК;
Физиологические (функциональные) признаки	
<ul style="list-style-type: none"> - Состояние (свойство) индивидуальной клетки; - Иницируется физиологическими и нефизиологическими факторами; - Изменение физиологических свойств биомембран и мембранных каналов: - Фагоцитоз соседними клетками и макрофагами; - Отсутствие воспаления; 	<ul style="list-style-type: none"> - Состояние группы (массы, слоя) клеток - Иницируется нефизиологическими факторами; - Нарушение целостности биомембран; - Фагоцитоз только макрофагами; - Наличие воспалительного процесса;
Морфологические признаки	
<ul style="list-style-type: none"> - Образование клеточных пузырьков; - Отсутствие признаков повреждения мембран; - Агрегация хроматина у ядерной мембраны; - Клеточные органеллы морфологично сохранены; - Конденсация, сморщивание, уплотнение клетки; - Образование апоптозных телец; - Морфологическая конфигурация органов сохранена 	<ul style="list-style-type: none"> - Потеря целостности биомембранами; - Флоккуляция (распыление) хроматина; - Набухание и дезинтеграция органелл; - Набухание клеток; - Лизис клетки и ее элементов; - Отек органов и тканей;

Представленные в табл. 17 данные охватывают большинство информативных биомаркеров, исследование которых может иметь существенное диагностическое и прогностическое значение для характеристики происходящих с участием МТН физиологических и патологических процессов.

Преобладающие определения апоптоза включают положение о том, что процесс программируемой смерти клеток завершается их удалением путем гетеролитической деградации и фагоцитоза. Однако при этом имеет место недооценка альтернативного пути – вторичного некроза, аутолитического процесса распада клетки с выходом компонентов во внеклеточное пространство, который происходит без вмешательства макрофагов, в тот момент, когда полная программа апоптоза уже закончена. Вторичный некроз – типич-

ное явление при многих видах патологии человека, по мнению М.Т. Silva [691], должен считаться естественным результатом полной программы апоптоза.

В рассматриваемых сложных суперсистемах найти и точно определить место и функции МТН представляется нелегкой задачей. Ее решение может быть найдено путем детального рассмотрения динамики процесса и роли его участников. Нарушение обеспечения МТН метаболических процессов в клетке с уменьшением, по разным причинам, пула интрацеллюлярного цинка индуцирует оксидативные повреждения ДНК, приводит к разрушению таких функционально важных белков, как р 53, NF-карра В, снижению процессов связывания AP1 ДНК и репарации ДНК в культуре клеток глиомы крыс [692]. Так, сравнительно недавно [693] был найден стимулирующий апоптоз фактор (AIF), который является новым апоптозным эффекторным белком, вызывающим уплотнение хроматина и крупномасштабную (50 kbp) фрагментацию ДНК при добавлении к изолированным ядрам *in vitro*. Методами конфокальной и электронной микроскопии показано, что в нормальных клетках экспрессия AIF строго ограничена, имеет внутримитохондриальную компартиментализацию и сопряжена с белком теплового шока с молекулярной массой 60 кДа (hsp60).

При индукции апоптоза стауроспорином, этопосидом, керамидом или с-Мус AIF (но не hsp60) транслоцируется в ядро. Это свидетельствует о том, что AIF, который предварительно перешел в межмембранное пространство митохондрий, выходит за пределы органеллы благодаря избирательному повышению проницаемости наружной митохондриальной мембраны. При этом внутренняя мембрана становится проницаемой только для hsp60, переходящего в матрикс митохондрий. Митохондриально-ядерному перераспределению AIF препятствует белок Bcl-2, мишенью для которого служит внутренняя мембрана МХ. Панкаспазный ингибитор Z-VAD fmk не предотвращает индуцируемую стауроспорином транслокацию AIF, хотя он и ингибирует фрагментацию олигонуклеосомальной ДНК и задерживает конденсацию хроматина на ранних стадиях апоптоза. Для транслокации AIF в

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ядро важным моментом является угнетение продукции АТФ в митохондриях, процесса, который, в частности, регулируется МТН [694].

АТФ в нормальных физиологических условиях образует комплекс с МТН в соотношении 1:1 (K_d 5 176 6 33 мМ, рН 7,4), который обеспечивает передачу Zn митохондриальным ферментам, обеспечивающим энергетический пул клетки, а также рост тиол-дисульфидного обмена (показано на примере реактива Элмана [5,5-дителиобис (*Z*-нитробензойная кислота)]. Другие пуриновые (АДФ и АМФ) и пиримидиновые (цитозин) нуклеотиды с МТН не связываются. Только МТН может обеспечивать Zn апоСДГ, активировать Zn-зависимую пиридоксалькиназу, являясь регулятором энергетического баланса в клетке. Наличие в молекуле МТН 8 остатков лизина, которые выполняют ключевую роль в поддержании кластерной структуры белка, в то же время обеспечивают его связывание с АТФ. Ядерная ретенция МТН требует энергии для «нуклеофильного» распределения белка. Особенно четко это прослеживается в раковых клетках, в которых дефицит энергии для роста и развития нередко лежит в основе усиления апоптоза, а управление процессом происходит преимущественно с участием тесно связанных с МТН представителей суперсемейства цитокинов (TNF, FasL, TRAIL, TWEAK), которые активируются также взаимосвязанными с МТН NF- κ B транскрипционными факторами [695, 696].

Этот феномен ускоряется при индукции апоптоза старуроспорином. Однако в условиях, когда и гликолитическое и дыхательное образование АТФ ингибированы, клетка не проявляет никаких признаков конденсации хроматина и фрагментации ДНК, т.е. умирает по некротическому фенотипу, несмотря на присутствие Z-VAD.fmk, в первую очередь, за счет угнетения образования АТФ и нарушения энергетики клетки. Транслокация AIF коррелирует с выраженностью признаков фрагментации ДНК. Последнему, как известно, препятствует индуцируемый в клетке и ее органеллах МТН [697]. Его роль в изменении энергетики клетки и генотоксических эффектах отражает регуляторные функции данного белка, которые в значительной мере связаны с процессом апопто-

за клеток.

В частности, регуляторная роль МТН отчетливо проявляется в индукции апоптозного процесса в тканях при нарушении поддержания баланса между апоМТН и металлизированным белком в клетках. Этот феномен может быть прослежен на примере изменения металлосвязывающей способности, существенного изменения числа активных тиоловых групп или динамики освобождения металла (будь-то эссенциального либо токсичного) металлизированным МТН. В этом отношении использование в качестве модели трансгенных животных оказывается весьма плодотворным для раскрытия механизма изучаемого явления. Оригинальными и убедительными в этом плане являются проведенные D.X. Deng et al. [698] исследования на мутантах мышей с врожденной невосприимчивостью к молоку. Уже во взрослом состоянии (в возрасте 11 - 12 мес) у них обнаруживали развитие регенеративных узловатых образований в печени, нарушение клеточной структуры органа с появлением больших нетипичных гепатоцитов. При этом происходило накопление в тканях печени Cu и развитие признаков, подобных таковым при болезни Вильсона у человека. Характерно, что в отличие от мышей дикого типа (контроль) с цитоплазматическим расположением внутриклеточного «обычного» МТН, у мутантных мышей основная часть клеточной меди была связана с МТН (Cu-МТН), уровень которого также резко возрастал. Интенсивное ядерное и цитоплазматическое накопление обогащенного медью Cu-МТН было обнаружено при иммуногистохимическом окрашивании роданином в нормальных и в нетипичных гепатоцитах мутантных мышей. Установлена корреляция между накоплением МТН-Cu и числом апоптозных клеток в печени. Эти результаты позволили авторам прийти к заключению о том, что мутантные мыши с возрастом накапливают избыток Cu в печени, что сопровождается типичными морфологическими изменениями, приводящими к узловатому перерождению органа. Нарушение динамики связывания и освобождения Cu из комплекса с МТН приводит к накоплению избытка Cu-МТН и Cu, которые могут обладать генотоксичным эффектом, в ядрах клеток, и приво-

дуть к росту апоптоза, лежащего в основе инициальных стадий цирроза печени. Вопрос о роли меди в функциях МТН в настоящее время активно изучается и далек от своего окончательного разрешения. Применительно к возможной интерпретации данных, полученных авторами цитированной выше работы, важным аспектом функциональной активности комплекса Cu-МТН является установление вида индуцируемой программируемой смерти гепатоцитов. В развитии цирротических изменений в печени существенную роль может играть не только апоптоз, но и аутофагия.

Аутофагия – тонко регулируемый ферментативный катаболический процесс, при котором содержимое цитоплазмы клетки подвергается полной либо частичной деградации, секвестрации и рециклизации в лизосомах (аутофагосомах), в результате чего клетка погибает [674]. Аутофагия участвует в поддержании гомеостаза, регуляции ключевых физиологических и патологических процессов в клетках, включая обмен поврежденных органоидов и длительно живущих белков [675].

Следует также подчеркнуть, что данный вид клеточной смерти широко используется организмами, стоящими на разных уровнях эволюционной лестницы, в физиологических, стрессорных и патологических условиях, как самостоятельно, так и в сочетании с ведущим видом программируемого суицида клеток – апоптозом.

Аутофагия – многостадийный процесс, характеризующийся стадиями индукции, расширения и завершения выделения участка изолированной мембраны (фагофора) с образованием аутофагосомы. Секвестрированные в нее цитозольные белки и органеллы затем доставляются в лизосому для деградации [699]. Напомним, что такой путь в лизосомы прорезывает также металл, связанный с МТН. Нередко именно с участием этого механизма может осуществляться выведение металла из клетки, а также удаление поврежденных токсичным металлом клеток. Процесс проходит через стадии индукции, нуклеации, распространения и завершения. При этом формируется изолированная мембраной область клет-

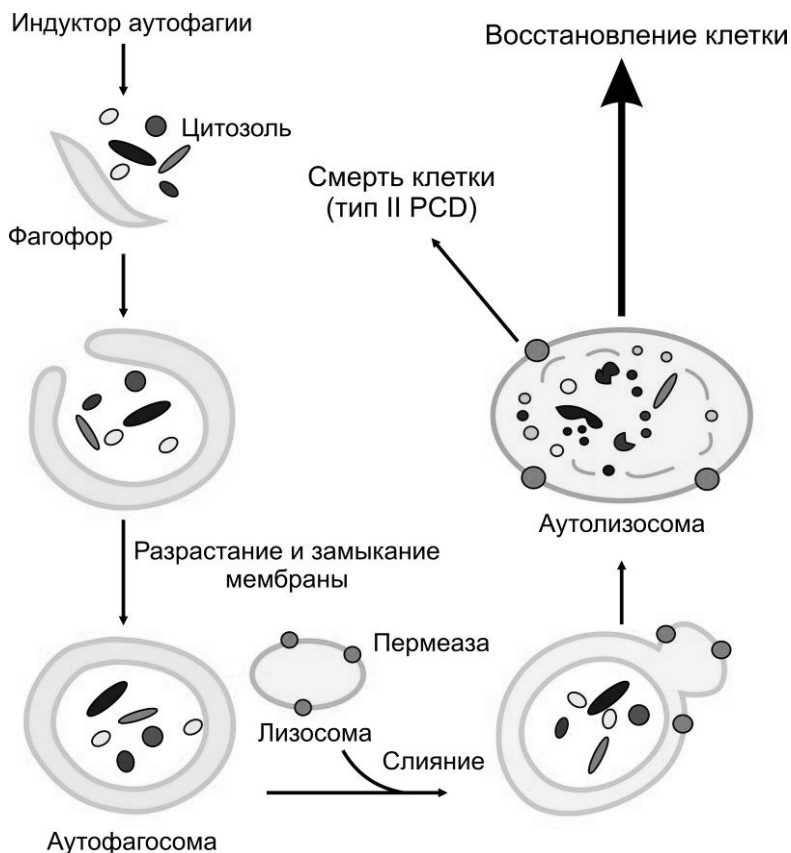


Рис. 34. Развитие аутофагии.

ки (именуемая также фагофорой), которая превращается в специализированную органеллу – аутофагосому. В нее секвестрируются цитозольные белки, целые клеточные органеллы. Содержимое аутофагосомы доставляется затем в лизосомы для деградации (рис. 34).

Путем аутофагии за счет массивной деградации эндогенного материала клетки способны перерабатывать питательные вещества и обеспечивать процессы жизнедеятельности энергией при голодании и стрессе [684]. Вклад аутофагии в обеспечение физиологического гомеостаза может

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

быть продемонстрирован результатами исследований, в которых ATG-0 мыши (с удаленными ATG-генами) умирали в течение дня после рождения [685, 686]. С другой стороны, чрезмерный уровень аутофагии в результате ее гиперэкспрессии получил название ATG-зависимой программируемой смерти клеток II-го типа (первый тип – апоптоз). Проведенными на дрожжевых клетках исследованиями показано, что существует более 30 ATG генов, которые вовлекаются в этот процесс. Многие из них идентифицированы у млекопитающих.

Нарушения работы этой системы самоуничтожения клеток связаны с широким диапазоном патологических процессов, включая нейродегенеративные, инфекционные болезни и рак [687, 688]. Аутофагия активируется в ответ на многочисленные разнообразные стрессорные условия и гипоксию, недостаточное и несбалансированное питание, в процессе прогрессирования рака, а также как осложнение в связи с применением широкого спектра цитостатических химиотерапевтических средств [689, 690].

Ярким примером в этом плане представляют макрофаги, которые осуществляют свои многочисленные разнообразные физиологические функции, широко используя при этом механизмы аутофагии, в том числе и за счет быстрой и эффективной экспрессии MTH, который взаимодействует в данном контексте с компетентными цитокинами. Важным полифункциональным цитокином является TWEAK, относящийся к суперсемейству факторов некроза опухолей, который связывается с Fn14. TWEAK и Fn14 экспрессируются в атеросклеротических бляшках, особенно в местах скопления макрофагов и вспененных клеток. K. Schapira et al. [700] изучали роль TWEAK/Fn14 взаимодействия у ApoE(-/-) мышей *in vivo* и макрофагах из костного мозга в опытах *in vitro*. Для этого воздействовали на мышей ApoE(-/-) ингибирующим TWEAK сцепленным белком Fn14-Fc на ранних (возраст 5-17 нед) или более поздних (возраст 17-29 нед) стадиях жизнедеятельности. Воздействие белком Fn14-Fc приводило к более раннему образованию бляшек на дуге аорты, которые были мелкими на ранней стадии и сопровождалась лихорад-

кой на поздней стадии воздействия. При обоих видах воздействия фиброзный компонент был слабее выражен. Во втором случае число макрофагов возросло, а их размеры уменьшались. Интересно отметить, что число апоптозных клеток при этом не изменялось. Важно подчеркнуть то обстоятельство, что количество захватываемых макрофагами модифицированных липидов при блокировании TWEAK ингибитором Fn14-Fc в опытах *in vitro* существенно снижалось (т.е. инактивировалась их ведущая антиатеросклеротическая функция). Авторы считают, что сцепленный белок Fn14-Fc не предотвращает возникновения инициальной стадии образования атеросклеротических бляшек. Однако, он ингибирует прогрессирование процесса развития и увеличения их количества, одновременно способствуя появлению уникального фенотипа бляшек с повышенным содержанием макрофагов малого размера, которые причастны к процессу захвата и снижения перемещения в бляшки липидов. TWEAK/Fn14 регулирует атеросклеротический процесс и является медиатором захвата и удаления липидов макрофагами. Высокий уровень экспрессии МТН в этих клетках способствует процессу захвата ими липидов без признаков активации их перекисного окисления и развития оксидативного стресса. Это может иметь значение и играть положительную роль в профилактике и терапии атеросклероза.

Эти данные наглядно иллюстрируют многоаспектный характер регуляторных функций МТН, в том числе в кардиопротекции и кардиодезинтоксикации. Специально выведенная линия трансгенных мышей со специфичной кардиальной гиперэкспрессией МТН (MT-TG) проявляют высокую резистентность по отношению к диабетической кардиопатии, что обусловлено антиоксидантными и антиапоптозными свойствами металлотионеина. G. Zhou et al. [701] описали происходящий с участием МТН процесс защиты от индуцируемого ангиотензином II (Ang II) повреждения миокарда без и с участием сопутствующего диабета. Для этого изучали кардиальные эффекты Ang II в острых и хронических опытах на мышцах дикого типа (WT) трансгенных животных (МТН-TG) по показателю клеточной смерти кардиомиоцитов у новорож-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

денных мышей. При остром воздействии Ang II отмечен рост апоптоза кардиомиоцитов взрослых и новорожденных мышей, нитрозильное повреждение и мембранная транслокация никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидазы (NOX) изоформы p47(ρhox). Эти эффекты отсутствовали у мышей MTH-TG и их кардиомиоцитах, а также у мышей WT, которым предварительно вводили пероксинитрит или другие антиоксиданты, а также ингибиторы NOX (с учетом того факта, что активация этого фермента играет ключевую роль в индукции апоптоза Ang II). Длительное введение Ang II в течение 2 нед ежедневно в дозе 0,5 мг/кг также индуцировало развитие апоптоза и нитрозильное повреждение сердечной мышцы у диабетических и недиабетических мышей WT. В последующем, при исследовании миокарда мышей дикого типа через 1 и 6 мес после двухнедельной экспозиции Ang II отмечали гипертрофию, дисфункции и прогрессирующий фиброз миокарда, тогда как у MTH-TG мышей таких изменений не обнаружено. Авторы пришли к правомерному заключению о способности MTH подавлять индуцируемое Ang II нитрозильное повреждение миокарда, зависимое от гиперактивности NOX, а также развитие апоптоза у диабетических и недиабетических мышей, как непосредственно при воздействии гормона, так и на отдаленных стадиях последующего развития кардиопатии.

Как известно, 3β-гликогенсинтазокиназа (GSK-3β) играет важную роль в кардиомиопатиях. Известно также, что трансгенные мыши с гиперэкспрессией MTH обладают высокой резистентностью к индуцированной диабетом кардиомиопатии. Исходя из этих позиций, Y. Wang et al. [702] изучали, насколько гиперэкспрессия MTH защищает сердце от диабетических поражений миокарда, используя в качестве биомаркера показатель степени ингибирования и инактивации GSK-3β. Для этого у мышей с трансгенной гиперэкспрессией MTH и контролем дикого типа индуцировали развитие диабета с помощью стрептозотоцина. Затем, с помощью ПЦР, Western-blot и иммуноферментного анализа определяли показатели энергетического обмена, накопление липидов, нитрозильные повреждения и фиброзное перерождение у

этих мышей через 2, 8 и 20 нед после инициации диабета, тогда как у особой трансгенной группы таких изменений не обнаружено. Экспрессия гексокиназы, повышенное фосфорилирование GSK-3 β , изменения в активности других ферментов, ответственных за клеточный метаболизм глюкозы и липидов, приводили у диабетических мышей дикого типа к накоплению кардиальных липидов, развитию воспаления (рост уровней активатора-ингибитора плазминогена 1 [PAI-1], фактора некроза опухолей [TNF- α], молекул внутриклеточной адгезии 1 [ICAM-1], признаков нитрозильного разрушения клеточных мембран [накопление 3-нитротирозина] и фиброзу. Наступление этих информативных патологических признаков полностью отсутствовало у трансгенных по металлотиионеину (MT-TG) диабетических мышей при условии гиперэкспрессии MTH. Важно отметить также, что перечисленные патологические признаки отсутствовали также у диабетических мышей при условии ингибирования активности GSK-3 β путем введения специфичного ингибитора данного фермента. Результаты исследований показывают, что активация GSK-3 β играет решающую роль в обусловленных диабетом изменениях энергетического обмена в миокарде, а инактивирующий этот фермент MTH является ключевым звеном в механизме профилактики кардиальной миопатии.

Подробное изложение результатов проанализированного выше исследования имеет целью обратить внимание читателя на три важные позиции, имеющие прямое отношение к MTH и аутофагии:

1. Повышенная экспрессия MTH защищает организм при диабете от развития обусловленных данным видом патологии кардиомиопатий.
2. Имеет место прямое либо косвенное участие MTH в реакциях энергетического обмена в кардиомиоцитах (его углеводной и липидной составляющих), что существенно дополняет известные положения о его регулирующей клеточный метаболизм роли в эпителиоцитах, энтероцитах, астроцитах, гепатоцитах, макрофагах, иммунокомпетентных клетках (Т и В-лимфоцитах).

3. Регуляторные и защитные функции МТН реализуются путем взаимодействия с представителями широкого круга белков, представителей других управляющих систем (про- и противовоспалительных, ферментных, адгезивных, некротических), дисбаланс которых в стрессорных и патологических условиях приводит к клеточной смерти, в том числе и аутофагии функционально либо метаболически несостоятельных клеток.

Таким образом, приведенные в настоящем подразделе данные подтверждают основную концепцию проблемы биологической роли МТН, которая постулирует наличие у белков данного семейства сигнальных, регуляторных и защитных функций, проявляемых ими на всех этапах жизнедеятельности нормальных и патологически измененных клеток. Большой интерес в этом плане представляет специфически реализуемая способность активированного внешними и внутренними сигналами биосинтеза МТН к участию в запуске, протекании и организации последствий при различных видах клеточной смерти. Особенно четко функциональная взаимосвязь между уровнем экспрессии МТН и запуском программы умирания клетки прослежена применительно к каспазному и митохондриальному вариантам апоптоза. В большом количестве экспериментальных (*in vitro* и *in vivo*), клинико-физиологических исследований рассматриваются многочисленные аспекты взаимосвязанного с геномом клетки, стадиями митоза и возрастом основные механизмы запуска апоптоза. При этом уровень экспрессии МТН в клетке является ключевым маркером функциональной состоятельности клетки и решения вопроса о необходимости ее удаления из клеточного сообщества. При этом внеклеточный МТН взаимодействует с разнообразными по своей природе и источникам стрессорами (ТМ, липополисахариды, АФК, гормоны, интерлейкины и др.), является индикатором достаточности защитного потенциала клетки и его резервов. Подключение к клеточным реакциям на различные формы стресса внутриклеточного и внеклеточного МТН осуществляется различными механизмами, мультимодальный характер которых

обусловлен самой уникальной структурой и свойствами этого белка. Поэтому существует несколько возможностей для такого рода управляющих действий. Во-первых, это мобилизация динамически связанного с МТН цинка, который используется клеткой для усиления процессов биосинтеза белков, в том числе, участвующих в защитных реакциях ферментов, конкурентным взаимодействием с токсичными металлами, активацией иммунных процессов и др. Во-вторых, наличие в МТН мощного пула активных сульфгидрильных групп, способных к окислению, обеспечивает участие МТН в гашении свободных радикалов и АФК. В третьих, защитная роль МТН обеспечивается наличием системы металлизированной МТН - апоМТН. В четвертых, большую роль в адаптивных возможностях обеспечивает двухкластерная структура МТН, которая обладает большими возможностями к связыванию с различными лигандами.

Перечисленные особенности структуры и функций МТН проявляются при запуске и протекании сложного и многокомпонентного процесса апоптоза. Важно подчеркнуть при этом взаимосвязь МТН со многими сигнальными и регуляторными белками, влияние на проявление функций которых доказано в опытах на трансгенных, нокаутных по МТН животных и клеточных системах.

Все вышеизложенное позволяет прийти к заключению о наличии глубоких и разноплановых взаимосвязей МТН с процессом апоптоза в различных типах нормальных и трансформированных клеток. Это определяет интерес специалистов клинического профиля к изучению синтеза, эксперсии и ингибированию МТН.

Исследования по изучению механизмов действия и физиологической роли МТН способствовали раскрытию фундаментальных механизмов, лежащих в основе не только апоптоза, но и других видов клеточной смерти. Среди наиболее важных в биологическом плане прорывов следует указать на появление концепции о программном характере некроза, спонтанность и неуправляемость которого в течение многих лет служила основным отличительным признаком

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

некроза от апоптоза. Влияние МТН на проницаемость и жизнеспособность клеточных мембран, его причастность к регуляции осмотических процессов в клетке показали наличие элементов управления в некротической деградации нежизнеспособных клеток в том числе за счет усиления липолиза и изменения соотношения жирных кислот. Пусковым механизмом этой цепной реакции является активация свободно-радикальных процессов, которая становится возможной лишь при условии подавления биосинтеза и снижения цитоплазматического пула МТН.

Что касается третьего вида клеточной смерти (аутофагии), то участие МТН в ее протекании и развитии связано, в первую очередь, с важными функциями данного белка в иммунокомпетентных клетках лимфоидного ряда (Т- и В-лимфоциты), гранулоцитах, подвижных и иммобилизованных макрофагах. Этот перечень может быть существенно расширен применительно к специфике отдельных органов и систем. В частности хорошо известны примеры избирательной гиперэкспрессии МТН в эпителии проксимальных канальцев почек, тонкого кишечника, глиальных клетках и астроцитах головного мозга, секреторных клетках поджелудочной железы, мужских и женских репродуктивных клетках.

В целом, МТН выступает как мощный интегративный фактор, как в обеспечении функционирования клеток, так и их исключения из системы клеточных ансамблей, слаженный характер функциональной активности которых обеспечивает интеграцию интермедиарного обмена и продуктивность соответствующих физиологических систем. Нарушение такой взаимосвязи приводит, прежде всего, к потере элементов специфичности в системе клеточной дифференциации, роста и пролиферации, что лежит в основе туморогенеза и малигнизации клеток. Хотя обширная информация свидетельствует о защитных функциях мтн по отношению к опухолевому росту, накопившиеся за последние два десятилетия данные привели к снижению категоричности у приверженцев этой концепции. Это в первую очередь связано с данными о «защите» металлотионеином опухолевых клеток от действия химиотерапевтических средств, а также возможности ис-

пользования МТН как индикаторного биомаркера для прогнозирования направления развития опухолевого процесса и продолжительности жизни больных онкозаболеваниями. Вероятно, поэтому в литературе продолжается широкая дискуссия по различным аспектам взаимосвязи этого белка с процессом канцерогенеза.

4.6. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Одной из важных, доказанных результатами многих исследований особенностью МТН является высокий уровень их синтеза в растущих нормальных и опухолевых клетках, что, естественно, легло в основание гипотезы об их существенной роли в онкогенезе [703, 704, 705, 706]. Индукция синтеза МТН цитокинами, гормонами и другими цитостатическими агентами показательна с позиций причастности их к процессам пролиферации и дифференциации не только нормальных, но и патологически измененных клеток. Однако, хотя имеются убедительные данные о МТН, как о важном маркере опухолевого роста, многие детали сигнализации, механизмы активации и ингибирования синтеза, участия в процессе канцерогенеза, а также в пролиферации, дифференциации, апоптозе опухолевых клеток, их использования для прогноза степени малигнизации и ее исхода, остаются в центре дискуссий [707, 708, 709, 710]. Мы находимся на этапе сбора информации, экспериментальной и клинической проработки высказанных предположений и разнородных по своей значимости наблюдений, хотя за последние два десятилетия отмечается существенный прогресс в решении данной актуальной проблемы.

Накапливаются дальнейшие свидетельства предполагаемой роли МТН в развитии рака, повышении устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим средствам, а также ухудшении прогноза течения заболевания [711]. Индукция синтеза МТН цитокинами, гормонами и другими цитостатическими агентами показательна с позиций причастности их к процессам пролиферации и дифференциации клеток, в плане участия в клеточных механизмах защиты от

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

повреждений (положительная роль). Не случайно, у 84,2% пациентов с колоректальным и у 74,1% больных с гастроинтестинальным раком уровень МТН при биопсии соответствующих участков слизистой был существенно снижен по отношению к нормальной слизистой оболочке ($p < 0,0005$) [712]. В то же время многие исследования с использованием высокочувствительных иммуногистохимических методов показали наличие экспрессии и даже гиперэкспрессии МТН у ряда больных, особенно с опухолями органов дыхания и головного мозга, что не только существенно повышает устойчивость раковых клеток к действию радиационной и химиотерапии, но и резко ухудшает прогноз продолжительности жизни и выживаемости этой категории больных (отрицательная роль) [713-715].

Механизмы, лежащие в основе гиперэкспрессии МТН остаются недостаточно изученными. Экспрессия МТН может наблюдаться при действии на организм и непосредственно клетки-мишени разнообразных факторов, таких как факторы роста, цитокины и УФ-облучение [716, 717]. Гиперэкспрессия МТН обусловлена амплификацией соответствующих генов, что было отчетливо продемонстрировано на линиях клеток, подвергнутых хронической экспозиции Cd. Кроме того, мутация *Ha-ras* может также привести к росту транскрипции соответствующих генов и МТН.

Клональная гиперэкспрессия МТН в толстой кишке мыши при воздействии диметилгидразина связана с соматическими мутациями, происходящими в морфологически неизменной (нормальной) слизистой оболочке [718]. При оценке результатов, полученных на данной модели, было высказано предположение, что гиперэкспрессия МТН могла быть следствием цис-активируемых мутаций гена МТН либо транс-активируемых мутаций регуляторных генов [719]. В дальнейших исследованиях была прослежена экспрессия МТН в нормальной слизистой оболочке желудка, однако присутствие бактерий *H. pylori* и ограниченность данных не позволили сделать однозначное заключение о возможной роли этого процесса в ее пролиферативной функции [720]. Авторы сходятся во мнении о необходимости дальнейших

исследований в данном направлении, особенно, в отношении механизмов, динамики и физиологической значимости процесса экспрессии МТН в нормальной слизистой оболочке различных отделов желудочно-кишечного тракта.

Поскольку МТН были открыты и идентифицированы прежде всего как металлсвязывающие белки, уже на первом этапе исследователи обратили внимание на вероятную взаимосвязь и возможность вовлечения указанных транспортных белков в патогенез онкозаболеваний [721-723]. Это вполне естественно, так как среди 600 химических веществ, на которые Комиссии экспертов МАИР (Международное агентство по исследованию рака) дали заключения о наличии либо отсутствии канцерогенности за 1972-1985 г., не менее 10 относятся к тяжелым металлам [724].

Шесть элементов и их соединения были однозначно определены как канцерогены: As, Be, Cd, Cr, Co и Ni [725]. За исключением As, главным путем поступления их в организм является ингаляционный, а ведущим органом-мишенью – легкие. Мышьяк, кроме того, вызывает развитие опухолей легких и кожи также при пероральном поступлении в организм. Кроме шестивалентного хрома, остальные канцерогенные металлы являются слабыми мутагенами. Эта особенность, как и механизмы их канцерогенности, остаются еще не раскрытыми.

Общим свойством As, Cd, Co, Ni является способность повышать мутагенность и канцерогенность других непосредственно действующих генотоксичных агентов. Эта особенность может быть объяснена, как способность данных металлов ингибировать восстановление поврежденной ДНК. Тем не менее, так как канцерогенные металлы сами способны вызывать развитие опухолей у экспериментальных животных, даже при исключении других канцерогенов, по отношению к ним должны быть также исследованы и рассмотрены иные вероятные механизмы.

Имеющиеся данные показывают, что соединения канцерогенных металлов изменяют характер экспрессии генов, приводя к стимуляции процесса пролиферации клеток, пу-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

тем активации протоонкогенов или путем взаимодействия с генами нерегулируемого клеточного роста. Особое внимание должно быть уделено эффектам Cd и As на экспрессию генов. Этот аспект интенсивно изучается. Он может дать ценный материал, как для клиники, так и для профессиональной безопасности и медицины труда.

В опытах на животных не было зафиксировано возрастания числа опухолей при употреблении кадмия внутрь. Такая тенденция наблюдалась только при вдыхании частиц пыли, содержащих неорганические соединения кадмия. Международным Агентством по Изучению Рака (МАИР) кадмий был отнесен к Группе 2A - "агенты, вероятно являющиеся канцерогенными для человека". Обзор о канцерогенности кадмия опубликован в 2000 году Waalkes, M. P. [726].

Поскольку канцерогенный эффект кадмия на сегодняшний день считается доказанным, ученые пытаются найти механизмы реализации этого процесса [727]. Основная роль в канцерогенезе при кадмиевой интоксикации (как острой, так и хронической) приписывается генерации активных форм кислорода и свободных радикалов (супероксид-анион, перекись водорода, гидроксид-радикал) что *in vivo* может быть подтверждено методом электронной спин-резонансной спектроскопии. Эти процессы часто сопровождаются активацией redox-чувствительных факторов транскрипции (e.g., NF- κ B, AP-1 and Nrf2) и изменением экспрессии генов, связанных с активными формами кислорода. Однако при длительной экспозиции малыми дозами прямая связь между повреждением АОС и токсичностью кадмия вовсе не очевидна из-за незначительного повреждения АОС. Вероятно, при таком воздействии индуцируются адаптационные механизмы (МТН, глутатион), которые снижают оксидативный стресс. В клетках, подвергнутых хроническому воздействию кадмия в низких дозах, снижение количества реактивных форм кислорода может быть зафиксировано флуоресцентным методом. Приобретенная таким образом толерантность к апоптозу (на уровне aberrации экспрессии генов) потенциально может способствовать канцерогенезу.

В экспериментах на культуре клеток *in vitro* и в экспериментах на животных *in vivo* было показано, что при экспозиции кадмием наблюдается трансформация клеток. При действии на животных образуются опухоли в разных органах и тканях. При наличии множества механизмов канцерогенеза, основными авторами также считают аберрацию генной экспрессии, индукцию оксидативного стресса и ингибирование апоптоза, отдавая предпочтение оксидативному стрессу, который может вызывать и повреждение экспрессии генов, и нарушение апоптоза [728].

Тем не менее, роль МТН в процессе канцерогенеза остается противоречивой. Ряд исследователей считают, что экспрессия МТН может быть прогностическим маркером прогрессирования опухолевого роста и ее устойчивости к химиотерапевтическим средствам при раке легких, простаты, яичников, мозга, меланом, саркоме мягких тканей [729].

Экспрессия МТН в тканях опухоли коррелирует главным образом с пролиферативной способностью клеток опухоли или с индукцией апоптоза [730, 731]. Повышенный синтез МТН рассматривается во взаимосвязи с клеточным циклом и может быть использован как маркер быстрого увеличения численности клеток в определенных типах опухоли. Экспрессия преимущественно наблюдается в клетках, находящихся в S-фазе [732]. Известно также, что преимущественно перинуклеарная локализация мРНК МТН является важным элементом для осуществления МТН защитной функции – предотвращения повреждений ДНК и апоптоза, которые индуцируются внешними стимулами, генерирующими стресс в тканях [733]. В ответ на стресс и D или экологические стимулы происходит быстрый и продолжительный повышенный синтез МТН с активацией клеточных механизмов защиты, способных нейтрализовать внешние сигналы к апоптозу [734].

Кроме того, МТН могут служить резервуаром эссенциальных металлов, прежде всего Zn, для апоэзимов и цинксодержащих пальцевидных белков, которые являются важными регуляторами процесса транскрипции в клетках. Это

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

физиологическое свойство МТН может по-разному использоваться в нормальных и раковых клетках: в первом случае речь идет о повышении устойчивости к внешним и патологическим факторам, а во втором – противодействию терапевтическим мероприятиям. Такое диалектическое единство делает позицию МТН в патогенезе опухолевого процесса неоднозначной и по данному, зависимому от обмена эссенциальных металлов, патогенетическому механизму.

МТН вовлечен в обмен и осуществление физиологических функций такими важными для нормальных и онкоизмененных клеток белков, как, например, р53, NF-κарраВ, РКСI, и ГТРаза Rab3A [735].

У подавляющего рост опухоли белка р53 есть ДНК-связывающий домен, стабилизируемый ионом Zn, который является необходимым для функционально активной конфигурации дикого типа р53 [736, 737, 738, 739, 740]. Хелатирование Zn разрушает архитектуру ДНК-связывающего домена белка р53, вызывая изменения его фенотипа и принятие им иммунологически идентичного фенотипу многих мутантных форм р53 вида [741]. Присутствующий в опухолевых клетках апоМТН способен удалять Zn из р53 и снижать его сродство к другим хелаторам Zn [742]. Если происходит постоянная гиперэкспрессия апо-МТН в клетках опухоли, она стимулирует их ускоренный рост и увеличение способности к выживанию путем индукции нулевого сайта белка р53. Недавно обнаруженная способность зависимых от МТН ингибиторных олигонуклеотидов тормозить рост и вызывать апоптоз у карциноматозных клеток дыхательных путей (протоков) [730], подтверждает выдвинутую ранее гипотезу, что даже при сравнительно редкой частоте мутаций генов, кодирующих белок р53, в случаях рака дыхательных путей этот механизм оказывает влияние на индукцию гиперэкспрессии МТН в раковых клетках. При реализации данного механизма отмечается сочетанный эффект супрессии белка р53, ответственного за подавление опухолевого роста за счет связывания его с ДНК или белковыми молекулами, с одной стороны, и высокой металлосвязывающей активностью избыточных количеств МТН, имитирующих вторичный (наведенный) де-

фицит эссенциальных металлов, с другой. Причем, так как белок p53 непосредственно участвует в функционировании точек контроля клеточного цикла, его недостаточно эффективный синтез или ускоренное разрушение (в норме период полураспада p53 составляет около 20 мин) нарушают все три механизма его воздействия на митотический цикл [667]:

- не происходит активации транскрипции генов, участвующих в остановке митотического цикла (WAAF1, GADD45);
- нарушается сложный и многокомпонентный процесс активации одних антиапоптотических генов (Bax, Fas,) и ингибирования других (IGFR1);
- замедляется процесс индукции апоптоза в присутствии ингибитора синтеза РНК и белков, непосредственно не связанный с активированной белком p53 транскрипцией генов; а обеспечивающий митохондриальный механизм апоптоза путем взаимодействия с белками Bcl-x₁ и Bcl-2, вследствие чего отмечается дкомпартиментализация цитохрома с и его выход из митохондрий в цитоплазму [742].

Тем не менее, основным механизмом, связанным с изменением функций белка p53 при опухолевом росте является появление его мутированных форм. Не случайно, частота выявления мутаций гена p53 и дизрегуляция других белков теплового шока при канцерогенезе превышает 50% [743], а при раке поджелудочной железы подавление активности белка p53 отмечается у более чем 75% пациентов [744].

Факторы транскрипции NF- каппаВ и другие белки этого семейства (p50, p65, p52, c-Rel, RelB and Bcl-3), как полагают [745], вовлечены в механизмы развития рака, на что указывают данные об их родстве с онкогеном v-Rel. Последующие исследования позволили идентифицировать онкогенные мутации, которые приводят к активации NF-кВ в малигнизированных лимфатических клетках, но большинство этих мутаций затрагивает также лежащие ранее в цепи малигнизации компоненты NF-кВ сигнальных путей скорее, чем непосредственно сами члены семейства NF-кВ. Активация

NF- κ B также наблюдалась во многих солидных опухолях, но до сих пор никаких онкогенных мутаций, ответственных за активацию NF- κ B, в карциномах не были идентифицированы. В таких раковых образованиях активация NF- κ B является скорее результатом воспаления или следствием формирования склонного к воспалительным реакциям микроокружения в процессе малигнизации и прогрессирующего процесса канцерогенеза. Наиболее важной является способность NF- κ B способствовать регуляции экспрессии цитокинов, таких как IL-6 или TNF- α , которые способствуют развитию опухоли. и переживающих генов, такие как Bcl-XL, Все это подтверждает ключевую роль NF- κ B в поддержании тесной взаимосвязи между воспалением и раком [746].

Возможная ассоциативная связь между NF- κ B и развитием злокачественных опухолей была выявлена на ранних этапах клонирования и расшифровки последовательностей (секвенирование) RelA/p65 [747]. Они позволили быстро установить NF- κ B родство c-Rel и его онкогенным дериватом v-Rel [748]. Однако, онкогенные мутации, которые сохраняют и обеспечивают активность RelA, c-Rel, или других NF- κ B белков в процессе малигнизации клеток были довольно редкими и ограничивались, главным образом, лимфомами [749]. Тем не менее, вскоре появились сообщения о новых малигнизированных образованиях, включая и солидные раки, что дало основание прийти к заключению о широком участии семейства регуляторных белков NF- κ B в канцерогенезе [750].

Факторы транскрипции Rel/NF- κ B регулируют некоторые важные физиологические процессы, включая связанные с развитием организма и формирования его систем, воспаление, иммунные ответные реакции на широкий круг стимулов, дифференциация и рост клеток, развитие опухолей и апоптоз, а также экспрессия собственных и вирусных генов [751]. В реализации этих функций участвует довольно большое количество белков на кооперативных началах, в том числе и такие важные регуляторные молекулы, как MTH [752]. Поэтому они также относятся к наиболее уязвимым молекулярным мишеням для фармакологических средств. Как зве-

няя многоуровневой системы сигнализации и модуляторы клеточного метаболизма факторы Rel/NF- κ B могут действовать на нескольких уровнях. В число их ингибиторов также входят разнообразные природные и синтетические соединения, включая антиоксиданты, протеосомальные ингибиторы, полипептиды и маленькие молекулы типа аминокислот, глутатиона и др. [753]. Некоторые из них являются общими ингибиторами синтеза Rel/NF- κ B, другие тормозят лишь компоненты системы, третьи (гормоны) действуют опосредованно, что, с одной стороны, характеризует сложность процесса дезорганизации роста и дифференциации клеток в ходе их малигнизации, а с другой, демонстрируют единство патогенетических механизмов развития опухолей, дегенеративных и воспалительных поражений организма [754].

В процессе онкогенеза нарушается вся многокомпонентная система транспорта и участвующих в ней белков. В частности, транспортер Zn ZIP4 (Slc39a4), который является важным белком для процесса развития у млекопитающих, а его ген относится к числу конститутивных у мышей, может также играть определенную роль в развитии рака поджелудочной железы. Было установлено [755], что этот эссенциальный транспортер Zn в нормальных клетках экспрессируется также в клетках гепатоцеллюлярного рака. Как уровень Zip4 мРНК, так и самого белка, существенно возрастает в гепатоцитах, включенных в онкотрансформацию по сравнению с интактными клетками у нокаутных по фарнезоидному X рецептору мышей. Потенциальные механизмы этого процесса были изучены на культуре клеток Нера и показали снижение уровня информационной РНК данного белка, резкое повышение апоптоза и умеренное снижение перехода клеток из G(0)/G(1) к S фазе, когда клетки выходят из-под блокады гидроксимочевины в среду с дефицитом Zn. Исследование миграции клеток свидетельствует о ее усилении у клеток линий Нера и MCF-7 с индуцированной гиперэкспрессией, тогда как торможение иРНК транспортера Zip4 в Нера клетках вызывает угнетение их миграционной способности *in vitro* [756].

Например, гиперэкспрессия гена, кодирующего метал-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

лотионеин, имеет место у 70,6 % пациентов с диагнозом - рак пищевода. МТН связан с резистентностью к цис-платине: у пациентов с МТН(+) опухолями после лечения цис-платиной пятилетняя выживаемость составила 26 %, а при МТН(-) -56 % [757, 758].

В работе [759] было показано, что МТН-1, МТН-2, МТН-3 и МТН-4 изоформы, найденные у млекопитающих, также вовлечены в некоторые аспекты канцерогенного процесса. Экспрессия МТН наблюдалась как неспецифическая быстрая реакция на любую форму стресса или повреждения, обеспечивающая цитопротекторное действие.

Хотя, как показывают обширные данные литературы, МТН активно участвует в канцерогенном процессе, его использование в качестве потенциального маркера дифференцирования опухоли, метаплазии и клеточной пролиферации, а также как показателя прогноза течения опухолевого процесса, остается неясным. Поэтому актуальными, как минимум, остаются перспективы использования МТН для защиты от токсичности при онкологических процессах и возможность использования показателя уровня МТН для диагностики состояния онкологических больных. Комплекс связанных с канцерогенезом вопросов экспрессии либо депрессии синтеза МТН, его нарушения металломеостатических, сигнальных, регуляторных и транспортных функций при различных видах патологии можно продолжить и расширить. Имеющиеся данные убедительно свидетельствуют об актуальности проблемы вовлечения и функциональной роли МТН в патогенезе различных заболеваний и отравлений, в том числе и отдаленных последствий антропогенной нагрузки на окружающую природную среду и условия жизнедеятельности человека. Причем, высокий уровень развития и множество различных видов, клинических и морфологических форм онкозаболеваний, комплексный и разноплановый характер лучевой и химиотерапии, позволяет использовать получаемые при изучении опухолевого роста в клинике и эксперименте, в опытах и на моделях *in vivo* и *in vitro* данные для разработки общей теории физиологических функций МТН и механизмов их нарушения в различных областях и разделах патологии и

клиники.

Полученная информация требует анализа и с общих теоретических позиций, так как она раскрывает важную проблему кооперативности в действии факторов защиты и повреждения в их единстве и взаимосвязи.

4.7. ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ, ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ

Уникальные свойства МТН, признание за ним защитных и регуляторных функций в патогенезе инфекционных, других воспалительных и дегенеративных патологических процессах и заболеваниях, в т.ч. нейродегенеративных и онкологических, явились основой интенсивного поиска путей и способов применения (либо стимуляции синтеза) данного белка в диагностических, терапевтических и профилактических целях. Исследования в этом направлении проводятся разными коллективами, в т.ч. и нашей лаборатории. Эти работы, как правило, пока имеют характер экспериментальных и эпидемиологических исследований.

Анализ накопленной в литературе информации по проблеме металлопротеинов показывает, что клинические и эпидемиологические исследования занимают в доступных публикациях важное место. Как уже упоминалось в подразделах настоящей монографии, посвященных изучению роли МТН в патологии человека и животных, среди наиболее разработанных в диагностическом и терапевтическом плане направлений следует выделить такие, как:

- МТН в профилактике и лечении металлопатий;
- МТН в лечении и защите от стресса;
- МТН в патогенезе воспалительных заболеваний;
- МТН в нейродегенеративной патологии.
- МТН в онкогенезе и терапии рака.

Именно в таком порядке попытаемся кратко рассмотреть вопросы клинической значимости и терапевтических возможностей белков рассматриваемого семейства МТН.

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Традиционным методом в диагностике не только металлостозов и металлопатий, но и обширного ряда других наследственных и приобретенных заболеваний, считается определение концентраций металлов в биосредах, в частности, в крови, моче и волосах. Уже само понятие «микроэлементоз», введенное А.П. Авцыным et al. [16], а также предложенная ими классификация данного вида патологии (табл. 18) строится на основополагающей рабочей гипотезе, что дефицит, избыток либо дисбаланс микроэлементов в организме лежат в основе патогенеза всех заболеваний этой группы. При этом, когда речь идет о микроэлементном дисбалансе, то под таковым понимается не только нарушение соотношения тех или иных микроэлементов, но и их дисрегуляция по Г.Н. Крыжановскому [760].

При этом первые две позиции могут быть проиллюстрированы (помимо отравлений тяжелыми металлами) такими, например, видами патологии, как болезнь Вильсона-Коновалова, с одной стороны, и Менкеса, с другой, при нарушении гомеостаза меди наследственного или приобретенного характера. Как было показано выше, количественные характеристики содержания Cu в биосубстратах могут служить информативными биомаркерами не только уровня обеспеченности этим эссенциальным металлом соответствующих биосистем, но и диагностическим признаком развивающейся металлопатии. Как правило, определению содержания меди в биосубстратах в этом случае сопутствует определе-

Таблица 18
Классификация микроэлементозов человека (адаптировано из [16])

Микроэлементозы	Формы заболевания	Этиопатогенетические особенности
Природные эндогенные	1. Врожденные 2. Наследственные	В основе врожденных — микроэлементоз матери. При наследственных — причина в дефектах или нарушениях генов
Природные экзогенные	1. Дефицит МЭ. 2. Избыток МЭ. 3. Дисбаланс МЭ.	Географические особенности, геологические аномалии эндемического характера, природные катаклизмы (например, извержение вулкана)
Техногенные	1. Профессиональные 2. Экогенные 3. Бытовые	Производственные вредности, загрязнение ТМ окружающей среды (воды, воздуха, почвы), а также жилых и других видов помещений (например, разлив ртути)
Ятрогенные	1. Дефицит МЭ. 2. Избыток МЭ. 3. Дисбаланс МЭ.	Применение лекарственных препаратов, оказывающих влияние на содержание МЭ в клетках, органах и тканях, либо на показатели белкового метаболизма, затрагивающие синтез и деятельность МТН

ние церулоплазмينا в сыворотке крови.

В этой связи представляется необходимым осуществление дифференцированного подхода к оценке показателей микроэлементного статуса организма и его функциональных систем на разных уровнях биологической организации. Пул биоэлементов в разных типах клеток, различных органах и тканях имеет свои качественные и количественные характеристики, которые следует учитывать при диагностике специфичных по конкретным ионам металлов микроэлементозах. При этом следует, безусловно, согласиться с конструктивной позицией А.В.Скального [761] о присущей практически каждому организму индивидуальной специфики микроэлементного статуса, а также наличия закономерных видовых, половых, возрастных особенностей, которые можно широко использовать в характеристике популяций, контингентов и отдельных особей.

Однако при этом необходимо помнить о диалектическом единстве и принципиальных различиях микроэлементного статуса организма как общебиологической закономерности, и, одновременно, о наличии определенной (оперативной) доли общего пула каждого отдельного микроэлемента. Последний является высокодинамичным и существенно изменяется по своим качественным и количественным характеристикам в ходе клеточного метаболизма и в патогенезе возникающих и развивающихся заболеваний. Именно вторая составляющая в наибольшей мере взаимосвязана с МТН и регулируется этим белком.

Поэтому однократное отдельно взятое исследование уровня того или иного иона металла (и даже их совокупности) в диагностическом плане малоинформативно, кроме случаев острого отравления. Исследование уровня МТН в биосубстратах существенно дополняет данные о содержании микроэлементов и служит чувствительным показателем напряжения данного звена метаболического статуса организма под влиянием каких-либо экзогенных либо эндогенных стимулов. Наиболее четко такая взаимосвязь прослеживается при нагрузке организма токсичными металлами и дефи-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ците эссенциальных микроэлементов. Это можно проиллюстрировать на примере кадмия и ртути. Они имеют сходный механизм токсического действия и относятся к так называемым «тиоловым ядам», блокирующим сульфгидрильные группы ряда ферментов. Тем не менее, как видно из табл. 19, имеют место определенные различия в механизмах токсического действия этих металлов, что необходимо учитывать при разработке программ лечебно-профилактических мероприятий.

Анализ приведенных в таблице данных убедительно показывает, что даже при действии типичных металлотороксикантов может наблюдаться интерференция отдельных показателей и маркеров патологического процесса, что существенно усложняет диагностику отравлений и химически обусловленных заболеваний (особенно при экспозиции малыми дозами). При этом рост концентрации МТН в крови (эритроцитах и сыворотке) может быть информативным дополнительным признаком отравления. Наши экспериментальные исследования показывают, что индукция синтеза МТН при действии рассматриваемых ТМ носит устойчивый и достаточно продолжительный характер (рис. 35). Динамика нарастания концентраций Cd и Hg (рис. 35) коррелирует с ростом уровня МТН в крови (рис. 36).

Адаптивный и антистрессорный характер наблюдаемых изменений признается большинством авторов, изучавших токсикодинамику экспозиции в эксперименте и клинике [[762, 763]]. При этом защитная роль МТН либо прямо и непосредственно связана с пулом биодоступного цинка, либо реализуется через антиоксидантный и противовоспалительный компонент. В первом случае изучение токсикокинетики цинка представляет согласованный с уровнем индукции МТН механизм, а во втором – изменение его содержания может и не в полной мере коррелировать со степенью экспрессии данного белка.

Признание двуединого подхода к оценке микроэлементного статуса организма в общефизиологическом и диагностическом плане позволяет дифференцированно подходить к выбору биосубстратов при проведении разноцелевых ис-

Таблица 19

Сравнение показателей токсического действия кадмия и ртути на организм человека и животных [55]

№ п/п	Наименование показателя	Кадмий	Ртуть
	Вид заболевания	«Итай-итай»	«Минамата»
	Система крови	Нарушения гемопоэза, анемия, лейкопения	Эритропения, нарушения метаболизма эритроцитов
	Нервная система	Неврологические нарушения: усиление коленного рефлекса, тремора, дермографизм, нарушение сенсорной и моторной хронаксии, увеличение частоты головных болей, головокружение, блокирующее действие на адренергические и холинергические синапсы.	Неврастения, вегето-сосудистая дистония, тремор рук, поражение центральной нервной системы, вплоть до психозов.
	Опорно-двигательная система	Остеопороз и остеомаляция	Накапливается в костях, нарушает функции остеобластов
	Сердечно-сосудистая система	Артериальная гипертензия (у мужчин)	Боли в области сердца, учащенное сердцебиение
	Мочевыделительная система	Нефропатия, тубулярная дисфункция	Дегенеративные изменения в печени и почках, протеинурия. Дискинезия мочевого пузыря. Тубулярный некроз.
	Гормональная система	Гормональные дисфункции, диабет, супрессия синтеза половых гормонов	Подавление синтеза тестостерона, гормонов щитовидной железы
	Энергетический обмен	Нарушение окислительного фосфорилирования, баланса АТФ/АДФ, усиление процессов ПОЛ	Активация процессов ПОЛ, снижение уровня восстановленного глутатиона
	Обмен микроэлементов	Нарушения обмена Al, Ca, Cu, Fe, Sn,	Неорганическая: нарушения обмена Ca, Cu, Se, Zn, органическая – Cu, Fe, Mn, Se
	Обмен витаминов и аминокислот	Нарушение обмена витамина D,	Нарушение обмена аскорбиновой кислоты, витамина B6 и цистеина.
	Репродуктивная функция, развитие плода	Поражение гонад, увеличение неонатальной смертности, тератогенное действие	Органические соединения ртути избирательно влияют на генеративную функцию, плод и потомство
	Ферменты	поражает ферментативную систему	Поражается гормональная регуляция
	Металлотионеины	Замещает Zn, прочно связывается, вытесняется Hg	Прочно связывается, подавляет активность как антиоксиданта и транспортные функции
	Желудочно-кишечный тракт	Поражает печень, поджелудочную железу, вызывает воспаление слизистой	Вызывает воспаление слизистой, гастрит, дискинезии кишечника
	Генотоксичность	Повреждения ДНК, экспрессия аберрантных генов	Повреждения ДНК, хромосомные aberrации, нарушения клеточного цикла
	Иммунитет	Угнетает гуморальный и клеточный иммунитет; вызывает атрофию тимуса и спленомегалию; активирует апоптоз иммунокомпетентных клеток	Подавляет синтез иммуноглобулинов и повреждает систему комплемента и лизоцима

следований. Для общебиологических и популяционных заключений наиболее информативными представляются данные о содержании микроэлементов в волосах. Для диагностичес-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

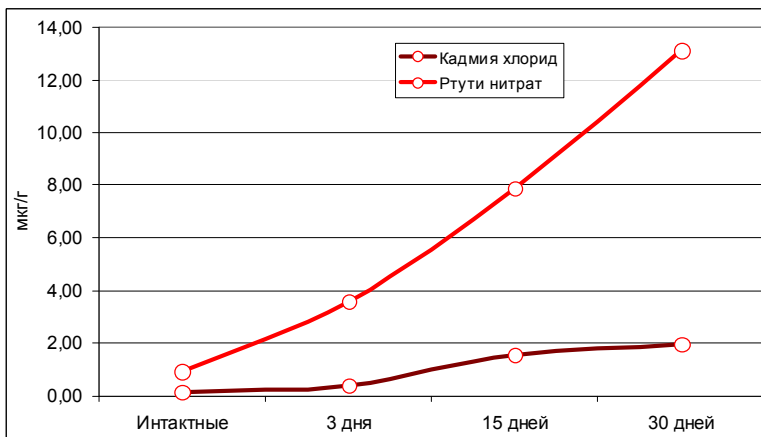


Рис. 35. Содержание металлов (Cd и Hg) в почках крыс после затравки в дозе 0,1 мг/кг (по металлу), мкг/г

ких целей, особенно в случае острых и подострых отравлений и заболеваний, более информативными являются данные об уровнях соответствующих микроэлементов в крови, слюне и моче. Однако, многие токсиканты (например, ртуть) быстро выводятся из крови, перераспределяясь в органы-мишени. Как показали наши исследования [764], уже через несколько суток после отравления парами металлической

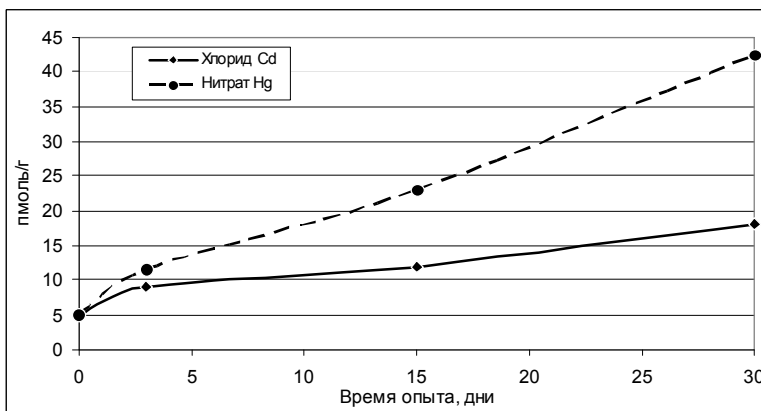


Рис. 36. Содержание металlothioneинов в крови крыс при разных сроках экспозиции солями кадмия и ртути в дозе 0,1 мг/кг.

ртути содержание ее в крови находится в пределах физиологической нормы (25 (50) мкг/л). В то же время содержание ртути в почках и печени по-прежнему остается высоким, и разрушающее действие ртути сохраняется. В этом случае для диагностики повреждений необходимо искать новые маркеры.

К числу таких широко применяемых в последние годы показателей относятся бета-2-микроглобулин и N-ацетил-бета-D-глюкоза, определение концентрации которых в моче применяется для диагностики острого отравления Cd. В то же время применимость их, особенно при долговременной экспозиции низкими уровнями токсиканта, отнюдь не очевидна и менее информативна. Поэтому именно МТН может быть предложен в качестве биологически чувствительного индикатора экспозиции низкими уровнями Cd [765]. У женщин с повышенной экскрецией МТН с мочой наблюдается положительная корреляция между логарифмом концентрации металлотioneина в моче и логарифмом концентрации в моче меди, общего белка, α 1-макроглобулина, β 2-микроглобулина, мочевой кислоты и фосфатов [766]. Следовательно, концентрация МТН в моче является чувствительным биоиндикатором нарушений, предшествующих тяжелой почечной дисфункции [767].

Действительно, при определении уровня МТН в моче [768, 769] у 5019 человек экологически экспонированных кадмием и 531 не подвергнутых воздействию кадмия (жители Японии) наблюдали дозозависимое увеличение концентрации МТН в моче при хронической нагрузке Cd, как у мужчин, так и у женщин. Средние уровни МТН в моче контрольной группы были $138,2 \pm 2,1$ и $198,6 \pm 1,9$ мкг/г креатинина, тогда как в основной они были на уровне $157,8 \pm 2,2$ и $248,0 \pm 2,2$ для мужчин и женщин, соответственно. Верхние пределы (97,5 %) в контрольной группе были 638 мкг МТН/г креатинина у мужчин и 693 мкг МТН/г креатинина у женщин. Металлотioneинурия была выявлена у 4,6 % мужчин и у 8,4 % женщин, проживавших в загрязненной кадмием зоне. Распространенность металлотioneинурии увеличивалась с возрастом и продолжительностью проживания в загрязненной области.

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Полученные данные подтверждают высокую информативность показателя содержания МТН в моче как индикатора почечной дисфункции при экологической экспозиции кадмием.

При профессионально обусловленной экспозиции достаточно высокими дозами тяжелых металлов мониторинг содержания МТН в моче может быть эффективным способом раннего выявления почечной дисфункции [770] наряду с определением содержания β_2 -микроглобулина. Уровень МТН в моче (при концентрации выше 1 мг/г креатинина) коррелирует с уровнем кадмия в крови и моче, а также с уровнем кадмия в печени и почках, определенном *in vivo* нейтронно-активационным методом.

В исследованиях последних лет [771, 772] для целей ранней диагностики металлопатий изучена возможность применения определения экспрессии генов МТН в лимфоцитах периферической крови рабочих, профессионально контактирующих с кадмием. Эти уровни коррелировали с логарифмом содержания кадмия в крови и моче. Другими словами, способность к экспрессии генов МТН лимфоцитами периферической крови *in vitro* обратно пропорциональна почечной тубулярной дисфункции и может использоваться как чувствительный биомаркер потенциальной восприимчивости конкретного человека к воздействию кадмия, т.е. к способности противостоять такому воздействию. Похожие масштабные исследования проведены в Австрии, где на большой группе студентов были выявлены наиболее восприимчивые к воздействию ТМ [773]. Это особенно важно для профессионального отбора в условиях страховой медицины, чтобы минимизировать вредное воздействие производственной среды на организм работающего.

Определение МТН и уровней эссенциальных металлов является информативным инструментом и для других видов металлопатий [774]. Так, содержание МТН у пациентов с циррозом печени и гепатоцеллюлярным раком были значительно ниже, чем таковые у больных хроническим гепатитом и у представителей контрольной группы. Напротив, уровни

меди у пациентов с циррозом печени и гепатоцеллюлярным раком были значительно более высоки, чем у пациентов с хроническим гепатитом и контрольными группами. Концентрации цинка у пациентов с хроническим гепатитом и гепатоцеллюлярным раком были ниже, чем таковые у контрольных групп. Используя эти три параметра, авторы вводят новый параметр, $(Cu/Zn) / MTH$, который различается у пациентов разных групп. Новый параметр, однако, не позволяет ясно различать цирроз печени и гепатоцеллюлярные группы рака. По нашему мнению, при поражении печени – основного места синтеза МТН – концентрации этого транспортно-го белка закономерно снижаются, при этом нарушается транспорт металлов, причем не только цинка и меди, а также кадмия и ртути.

Действительно, при определении содержания МТН и тяжелых металлов в крови пациентов, недавно перенесших гепатиты разной этиологии, мы регистрировали МТН на уровне 61-67 % от среднепопуляционной нормы. Концентрации Cd, Hg и Cu были значительно повышены либо приближались к порогу допустимого уровня. Так, среднее содержание кадмия в крови составляло $8,1 \pm 1,1$ мкг/л (при МДУ < 10 мкг/л), ртути - $19,1 \pm 3,3$ мкг/л (при МДУ < 25 (50) мкг/л), в то время как его среднее содержание в крови у здоровых людей в наших исследованиях редко превышало 3 мкг/л, а ртути – 8 мкг/л.

В этой связи применительно к диагностике металлопатий следует указать на тот факт, что в подавляющем большинстве опубликованных работ указывается на определение МТН в цельной крови. Такой подход существенно суживает объем информации о возможных нарушениях функции данного белка в патогенезе заболеваний. Более информативным является раздельное определение МТН в эритроцитах и плазме крови, поскольку во-первых, содержание МТН в эритроцитах примерно в 10 раз выше, во-вторых, интрацеллюлярный и внеклеточный МТН существенно отличаются по выполняемым функциям. Не случайно, например, американская организация нутриологии предложила использовать в качестве показателя алиментарной обеспеченности биодоступ-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

ным цинком содержание МТН в эритроцитах крови совместно с определением содержания цинка в плазме [775].

Таким образом, приведенные данные, наряду с информацией предшествующих глав, свидетельствуют об информативности определения МТН в биосустратах (наряду с исследованием ТМ) в диагностических целях при возникновении металлопатий и металлотороксикозов.

Среди присущих МТН защитных функций одной из ведущих является участие в механизмах борьбы с возникающим при самых разнообразных видах патологии оксидативным стрессом. Множественный склероз - хроническое заболевание ЦНС, в которой оксидативный стресс играет основную роль в развитии миелинового и нейронного повреждения [776]. Повышенные количества МТН-1 и МТН-2 были найдены в мозгу пациентов с множественным склерозом. Наибольшее количество МТН продуцировали астроциты и активные моноциты/макрофаги. Поскольку интенсивность экспрессии обеих изоформ данного белка коррелировала с активностью патологического процесса, авторы высказывают предположение о возможной важной роли металлотионеинов в процессе ремиссии заболевания.

Несмотря на то, что вопрос о механизме антиоксидантного действия МТН до конца не решен и находится в стадии активного изучения, эта относительно недавно открытая функция МТН делает возможным использовать его при терапии и диагностике состояний, вызванных экзогенным или эндогенным стрессорным воздействием избыточного количества свободных радикалов (активных форм кислорода). В этой связи представляются чрезвычайно важными для диагностики индуцированных ТМ заболеваний исследования, проводимые на геномном уровне с помощью ПЦР и микроматриц. В частности, было показано [777], что воздействие Cd приводит к изменению уровня экспрессии генов, участвующих в процессах онкогенеза, протекания клеточного цикла, апоптоза и оксидативного стресса.

Механизмы, определяющие канцерогенный потенциал Cd, интенсивно изучаются с использованием лабораторных

животных в опытах *in vivo* и на моделях в культуре клеток *in vitro*. Были установлены причинно-следственные взаимосвязи между частотой рака легких у человека и экспозицией Cd. Это не случайно, поскольку население экспонируется данным металлом, получая ежедневно с водой и пищей порядка 8-25 мкг Cd. Еще 1-2 мкг поступает в организм через органы дыхания с каждой выкуренной сигаретой [778].

Было продемонстрировано, что среди механизмов индуцируемого Cd рака наиболее весомами являются: экспрессия аберрантных генов, замедление восстановления повреждений ДНК, индукция оксидативного стресса и апоптоза. При этом, возможно, оксидативный стресс играет центральную роль в канцерогенезе из-за его участия в индуцированной Cd экспрессии генов, участвующих в супрессии процессов восстановления повреждений ДНК и активации апоптоза [779]. Поскольку МТН непосредственно связан с клеточным транспортом и гомеостазом Cd и других тяжелых металлов, обладающих канцерогенными свойствами, величина и направленность изменений, отражающих динамику синтеза этого белка и его изоформ, являются информативными биомаркерами при диагностике и оценке эффективности терапии онкозаболеваний [780].

В этом плане весьма информативными биомаркерами могут быть отдельные изоформы МТН, которые по-разному экспрессируются при различных видах онкопатологии (табл. 20).

Как видно из приведенных в таблице (а также в соответствующем подразделе настоящей монографии) данных, накоплен большой объем информации об участии и роли МТН и его отдельных изоформ в патогенезе, диагностике и прогнозировании течения опухолевого процесса в организме. Имеющиеся данные свидетельствуют о сложных взаимосвязях МТН с онкогенезом в разных органах и тканях, заинтересованности генетического аппарата клетки с изменением динамики клеточного цикла, о включении в процессы малигнизации достаточно большого числа факторов, регулирующих рост и дифференциацию клеток, к числу которых отно-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Таблица 20

Роль отдельных изоформ МТН при разных видах опухолевого роста [781]

Виды рака	Изоформы МТН	Роль в патогенезе
Рак легких	МТН-1 А, Е, F, X, H, G, МТН-3, МТН-2А.	1) МТ-1Е: Альтернативные (опухолевые) процессы в тканях, изменяющие функциональную активность эстрогенов, например, при раке молочной железы. 2) МТН-3: Пессимистичный прогноз у пациентов с раком молочной железы. 3) МТН-2А: Прямая корреляционная взаимосвязь с уровнем пролиферации клеток и их гистологической принадлежностью. 4) МТН-1F: если обнаруживаются в ткани легких, то необходима гистологическая дифференциация от инвазивного рака молочной железы.
Рак почек	МТН-1А, МТН-1G, МТН-IX, МТН-3	1) МТН-3: Интактные почки, клетки карциномы почек, раковые клетки мочевого пузыря (отсутствие в норме), аденокарцинома простаты. 2) МТН-IX: Рак мочевого пузыря.
Рак предстательной железы	МТН-1А, МТН-1Е, МТН-1Х, МТН-2А, МТ-1, МТН-2.	1) МТН-IX: Развившийся рак предстательной железы. 2) МТН-1, МТН-2: пролиферация клеток рака молочной железы, кишечника и простаты.
Папиллярный рак щитовидной железы	МТН-1, МТН-2.	Клетки тиреоидного рака (клетки КАТ5) + обогащенные Ca ²⁺ клетки ERK1/2 ? 8 функциональных изоформ МТН-1 и МТН-2, индуцируются Cd ? экспрессия МТН + сокращение G0 и G1 фаз клеточного цикла, рост продолжительности G2-M фазы ? появление новых путей и включение новых механизмов экспрессии МТН

сятся белки семейства МТН и его изоформы.

Исследования в направлении дальнейшего изучения и углубления несомненно существующих взаимосвязей экспрессии МТН с опухолевым процессом в организме должны быть продолжены с повышенной интенсивностью, поскольку остается много нерешенных вопросов в этой актуальной проблеме биологии и медицины. Среди них представляются первоочередными такие, как:

- дифференциация позитивной (защитной) и стимулирующей онкогенез функций МТН в опухолевых и прилежащих к ним нормальных клетках;
- особенности сигнальной функции МТН на ранних стади-

ях развития опухоли и возможность использования этой информации в диагностических целях;

- раскрытие механизмов активации генов МТН индикаторными молекулами опухолевых клеток;
- изучение особенностей взаимодействия МТН с факторами индукции апоптоза физиологически полноценных и трансформированных клеток;
- прогностическое значение МТН при разных видах опухолевого роста и др.

Особый интерес представляют вопросы терапевтического применения МТН в онкологии и других клинических дисциплинах. Поскольку эссенциальные и многие токсичные металлы являются мощными индукторами синтеза МТН, в настоящее время преобладает концепция, согласно которой назначение Zn и других микроэлементов в лечебных схемах практически автоматически вызывает экспрессию МТН, который включается в процессы детоксикации, гашения активных форм кислорода и борьбу с оксидативным стрессом, одним из универсальных механизмов в патогенезе подавляющего большинства заболеваний человека. Эта позиция представляется слишком оптимистичной. Во-первых, она базируется на преимущественно результатах экспериментальных исследований, во-вторых, имеющаяся информация носит конкретный характер и приурочена к отдельным видам отравлений и патологии не химического генеза, в-третьих, эффективность применявшихся лечебных мер проверялась по произвольно взятым показателям, поскольку единый подход и четкие требования к исследованиям в данном, чрезвычайно сложном, направлении отсутствуют.

Высказанные соображения, естественно, носят конструктивный характер, поскольку авторы настоящей монографии уверены в необходимости и возможности успешной реализации перспективы использования МТН в лечебных целях. Тем более, что наработки в этом направлении имеются, а число исследований растет. Так, S. Sharma и M. Ebadi [782] за последние годы провели ряд экспериментальных и клинических исследований в указанном направлении. В час-

РАЗДЕЛ 4. МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

тности, они применили МТН как противовоспалительный агент в модельных экспериментальных исследованиях по изучению действия этилового спирта и ряда наркотических средств на культуре клеток (дофаминергические нейроны линий SK-N-SH и SH-S-YSY, в том числе с измененными генами МТН) интактных и мутантных мышей. Были прослежены дозовые и временные зависимости в сложной мозаичной картине защитного действия МТН при экспозиции этанолом, опиатами и их комбинациями, как основы рациональных терапевтических мероприятий. Именно в этом плане представляет интерес интегрированный подход к оценке лечебного потенциала МТН в контексте происходящих в нейронах и нервной ткани нарушений нейротрансмиссии и иммуно-воспалительных нарушений.

Результаты этих и других проведенных исследований позволяют существенно расширить представления о возможностях, открываемых современными представлениями о функциях МТН при различных патологических состояниях организма, возможностями управляемого синтеза этого белка и его изоформ (избирательно) не только в самом организме больного, но и вне его (наработка лечебных препаратов МТН как терапевтических средств).

Помимо внедрения стимуляторов синтеза МТН для лечебных целей, что уже получило широкое распространение в медицинской практике, важным аспектом проблемы является торможение его активности за счет применения соответствующих супрессоров, регуляторов, кофакторов соответствующих видов действия МТН, а также специфических антигенов и антител, избирательно взаимодействующих с интрацеллюлярным, внеклеточным белком, соответствующими генами, рецепторами, управляющими молекулами. В этой проблеме лечебного использования МТН мы еще находимся в начале пути, который требует дальнейшей детальной разработки и решения.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В течение нескольких последних лет авторы настоящей монографии, параллельно с проведением экспериментальных и клинико-физиологических исследований по различным аспектам проблемы металлотионеинов, интенсивно проводили сбор и анализ накопленной в доступной печати информации, прямо или косвенно касающейся особенностей структуры, свойств этого белка, его физиологических функций и роли в патогенезе различных заболеваний. Это породило ряд вопросов, ответы на которые были найдены лишь частично, причем, на многие из них лишь гипотетически, только на концептуальной основе.

При работе с литературой было обращено внимание на постоянно возрастающий поток публикаций, несмотря на 50-летний опыт изучения данного белка. Почему, при наличии практически в каждой клетке человека и других млекопитающих сотен и даже тысяч белков, интерес многих исследователей в разных областях химии, биологии и медицины прикован к металлотионеинам, молекулярная масса которых не превышает 6-10 кДа, а из известных порядка 20 представителей семейства только 4 его изоформы имеют выраженную биологическую значимость? В чем выражается уникальность этого белка и как она проявляется в норме и патологии? Какова первичная физиолого-метаболическая функция металлотионеина (транспортная, антиоксидантная, регуляторная)? Представляют также большой интерес и требуют ответа такие вопросы, как компартиментализация в клетке и роль внеклеточного МТН, значение металло-белковых комплексов и апоМТН, взаимоотношения с другими транспортными белками, низкомолекулярными регуляторными молекулами, активаторами и ингибиторами клеточного метаболизма и многие другие. Причем, необходимо подчеркнуть, что в статьях и обзорах даже признанных авторитетов по металлотионеину на две трети таких вопросов авторы отвечают, что они остаются неизученными либо являются разработанными недостаточно. В результате проведенного анализа литературы и собственных исследований ответы на мно-

гие вопросы получили свое освещение в настоящей монографии.

Исходной позицией, определяющей во многом уникальные свойства МТН, является наличие выраженной специфики его молекулярного строения.

Структурные особенности МТН определяются отсутствием в пептидной цепи ароматических аминокислот, высоким содержанием остатков цистеина, высокой динамичностью вторичной структуры (двойная складчатость), двукластерной организацией третичной и четвертичной молекулы, ее металлизацией атомами Cu и Zn со значительной вариабельностью энергии координационных связей. МТН млекопитающих состоят из двух доменов: β -домен (аминокислоты 1-30) содержит 10 остатков цистеина и α -домен (аминокислоты 31-61) с 11 остатками цистеина. Все цистеины образуют 2 вида устойчивых кластеров cys-cys или cys-X-cys. Именно эти кластеры обладают способностью образовывать тетраэдрические структуры с переходными металлами групп 1В и 2В, в которых катион металла координирован с 4 цистеинами. Эта структура отличается динамизмом и может трансформироваться в тригональную. По своей аффинности к МТН металлы образуют ряд: Ag>Hg>Cu>Cd>Zn>Co>Ni [783]. Эта последовательность во многом объясняет способность МТН обеспечивать биодоступным цинком внутриклеточные металлопротеины, что особенно важно в процессах роста и развития организма. С другой стороны, более прочное связывание токсичных металлов обеспечивает выполнение МТН детоксикационной роли. При этом все металлы в ряду, слева от цинка, известны как активные индукторы МТН.

Отдельные перечисленные особенности строения молекулы характерны и для других белков, однако, именно в МТН их сочетание уникально. Это делает молекулу металлопротеина чрезвычайно реактогенной, позволяет адаптивно изменять свою морфологию применительно к типологической специфике клеток, субклеточных компартментов, изменениям pH, температуры среды, наличию и составу других взаимодействующих и регулирующих метаболизм молекул.

Строение и функции МТН тесно взаимосвязаны с обеспечением значительной части метаболических процессов в клетке цинком, вторым по биологической значимости (после железа) эссенциальным элементом организма человека, животных и растений [19]. Он активно связывается и входит в состав порядка 3000 белков или 10 % всего человеческого протеома. Описано около 100 белков, способных транспортировать цинк в биообъектах. Это связано с его исключительной важностью для активности порядка 300 ферментов всех классов. Среди цинксодержащих биоактивных молекул можно упомянуть многочисленные пальцевидные белки, которые занимают ключевые позиции в клеточном метаболизме и функционируют как транскрипционные факторы, обеспечивая узнавание базовых последовательностей ДНК в процессе репликации и транскрипции. Однако, безусловно определяющую роль в жизнедеятельности клетки играет его вхождение в процессе металлизации в состав МТН, начиная от захвата и всасывания цинка в кишечнике и заканчивая его экскрецией в проксимальных канальцах почек. Именно МТН выполняет ключевую управляющую функцию в отношении гомеостаза цинка и обеспечения его биодоступности.

Роль поступающего с пищей цинка в управлении процессами роста и развития биологических систем прослеживается особенно четко на различных стадиях оплодотворения, беременности, развития плода и новорожденной особи. Гены МТН транскрипционно регулируются уровнем содержания цинка в питании и гормональными стимулами, что обеспечивает, в частности, высокие концентрации МТН в печени плода с постепенным снижением в постнатальный период. Дефицит цинка в этих условиях нарушает экспрессию МТН [784]. Эти данные коррелируются с результатами новых исследований по выяснению роли цинка и МТН в процессах деления клеток и оплодотворения яйцеклетки. В 2010 году исследователи из Северо-Западного университета (Northwestern University) под руководством Терезы Вудруф (Teresa Woodruff) установили, что дефицит цинка ведет к нарушению овогенеза, в частности, созревания клеток-предшественниц яйцеклеток (овоцитов), при котором коли-

чество хромосом уменьшается вдвое (мейоз). У цинк-дефицитных овоцитов асимметричность деления наблюдается в 75% случаев.

В генеративных органах цинк выполняет роль блокатора процесса деления созревающей яйцеклетки. После оплодотворения яйцеклетка избавляется от избытка цинка путем экзоцитоза цинксодержащих аутофагосом. Выброс цинка носит дискретный, импульсный характер. Удаление из неоплодотворенной яйцеклетки цинка ведет к индукции процесса деления. Этот процесс оказалось возможным стимулировать путем снижения внутриклеточной концентрации биодоступных ионов цинка, что взаимосвязано с изменением уровня интрацеллюлярного кальция.

Оплодотворяющий сперматозоид инициирует цепь биохимических реакций с общим названием «активация яйцеклетки». Это сопровождается временным возрастанием в яйцеклетке внутриклеточного Ca^{2+} с последующим гранулярным экзоцитозом и возобновлением мейоза. Тирозиновые протеинкиназы (РТК) являются вероятными индукторами процесса активации яйцеклетки. Семейство SFKs-киназ, которые входят в суперсемейство РТК, обеспечивает регуляцию уровня внутриклеточного Ca^{2+} при оплодотворении. На важность этого управляющего воздействия в ооцитах указывают R. Tomashov-Matar et al. [785].

В последние несколько часов созревания ооцит мыши поглощает около 20 млрд атомов Zn и останавливает после первого мейоза до оплодотворения или фармакологической стимуляции дальнейшее протекание клеточного цикла с образованием нового эмбриона [786]. После оплодотворения обогащенная Zn яйцеклетка выбрасывает металл в экстрацеллюлярное пространство серией импульсных выбросов. Эти события следуют в строгом соответствии с осцилляциями концентрации Ca^{2+} в активированных ооцитах грызунов и у нечеловекообразных приматов. Импульсные выбросы Zn способствуют снижению его интрацеллюлярного содержания, что необходимо для дальнейшего прохождения клеточного цикла, поскольку он останавливает клеточный цикл в

метафазе. Таким образом, Zn выступает регулятором клеточного цикла и раннего развития эмбриона, что коррелируется с повышенной индукцией синтеза МТН.

Работами последних десятилетий показано, что начиная с раннего периода внутриутробного развития эмбриона астроциты и нейроны в головном мозге образуют высокодинамичную и обладающую обратной связью функциональную систему, которая в течение всей жизни обеспечивает рост, дифференцировку, образование структурно-функционального комплекса и его работу, а также старение, восстановление и смерть, клеток, систем и организма в целом.

Значение преимущественного распределения МТН-1 и МТН-2 в астроцитах остается недостаточно изученным. Стратегические позиции, занимаемые астроцитами вокруг эндотелиальных клеток, нейронов и глиальных клеток разных типов позволяют считать, что астроцитам принадлежит ведущая роль в защите всех видов мозговых клеток от цитотоксических воздействий биоактивных веществ, находящихся в экстрацеллюлярной среде. Экспрессия МТН в астроцитах при криогенном воздействии на новорожденных крысят свидетельствует о том, что этот феномен связан не только с реакцией на сигналы от ионов металлов, но и другие, совершенно отличные по генезу стрессорные воздействия. С другой стороны, преимущественное распределение универсальных изоформ МТН в астроцитах является свидетельством их распределительной роли по отношению к разным мозговым структурам, находящимся в различно выраженной степени физиологической активности и функционального состояния.

Особенность избирательного участия МТН в таком распределении заключается в дифференцированном освобождении им ионов металлов не только в разных клетках (нейроны, астроциты, глия), но и клеточных компартментах. Например, Zn поступает преимущественно в митохондрии, аппарат Гольджи, где преобладают биосинтетические процессы, тогда как Cd сосредотачивается в лизосомах и эндосомах, ответственных за его выведение. Аналогичная ситуация имеет место в части распределения в астроцитах и ней-

ронах железа и его транспортеров (трансферрина и гемопексина). Трансферрин преимущественно накапливается в олигодендроцитах и небольшом количестве нейронов, тогда как гемопексин (белок, связывающий геминное железо), содержится преимущественно в нейронах, небольшом количестве популяций астроцитов и полностью отсутствует в олигодендроцитах.

Иная картина наблюдается, например, в эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек при кадмиевой интоксикации. Для них характерно преобладание цитозольной компартментализации ^{109}Cd (50-65 %), тогда как в митохондриях и лизосомах содержится порядка 5-15 % введенной метки. Интересным и недостаточно понятным является наличие 15-25 % Cd в ядерной фракции эпителиоцитов. G. F. Nordberg et al. [9] считают, что преимущественно цитоплазматическое распределение кадмия определяет его взаимодействие с одним из главных регуляторов клеточного метаболизма – Ca^{2+} .

В физиологических условиях именно находящийся в цитозоле кальций связан с функционированием транспортных систем в плазматической мембране клеток. Он также регулирует процессы транспорта в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме. В этой связи представляется вероятным, что транспорт кадмия через клеточные мембраны и субклеточные барьеры осуществляется через кальциевые каналы и с непосредственным участием регулятора, с которым у кадмия имеют место конкурентные взаимоотношения. Данная позиция подтверждается обнаружением кадмия в белках, образующих кальциевые каналы, а также взаимосвязью между концентрацией внутриклеточного кальция и степенью диссоциации комплекса Cd-MTH.

Рассмотрение многообразия видов функциональной активности MTH и положение о его ключевой роли в транспорте металлов аргументируется обширными исследованиями по эволюционному аспекту проблемы физиологии и функций MTH. Этот белок относится к категории не только наиболее распространенных в животном и растительном

мире, но и обнаруживается в видах, имеющих различный исторический возраст и стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы. Из этого очевидного факта вытекает два важных следствия. Во-первых, первопричиной биологической целесообразности и необходимости появления такого белка является функционирование древних организмов в насыщенной ионами металлов среде Мирового океана. Во-вторых, это обусловило появление семейства МТН и его изоформ, а также сочетание высокого динамизма (адаптивности) с высокой устойчивостью к внешним воздействиям (термостабильность, способность к обратимому окислению). В этой связи следует напомнить, что если у грызунов известно 4 изоформы МТН, то у человека их число достигает 20. Эти различия закреплены на генетическом уровне и проявляются как в обособленной экспрессии генов МТН-3 и МТН-4 от МТН-1 и МТН-2, так и в отсутствии сцепления генов последних изоформ у человека, в отличие от грызунов.

Таким образом, уже в эволюции МТН заложен двойственный противоречивый характер в сочетании его адаптивности и консерватизме морфофункциональных элементов. Так, среди двадцати известных изоформ МТН наиболее распространенными являются МТН-1 и МТН-2, тогда как, например, у такого универсального протектора клетки, как цитохром Р450 активно функционируют в живых системах практически все его 60 известных изоформ. Причем, число их неуклонно возрастает. Это может быть связано с принципиальными различиями участия сравниваемых клеточных протекторов по механизму действия. Роль цитохрома Р450 заключается в обеспечении функции микросомальных монооксигеназ, индуктивный синтез которых приурочен практически к каждому ксенобиотику.

МТН отличается полифункциональным механизмом защитного действия, который реализуется практически одновременно по разным направлениям, будь то связывание ТМ, гашение свободных радикалов и купирование оксидативного стресса, обеспечение синтеза ферментатов активным цинком и др. Поэтому распределение и различие в функциях основных изоформ МТН имеет принципиальное значение.

Наиболее четко это получило экспериментальное подтверждение применительно к месту и роли изоформ МТН в клетках ЦНС. Преимущественное распределение МТН-1 и МТН-2 в астроцитах отражает роль клеточного полиморфизма функций биодоступного цинка, а также других эссенциальных металлов, что имеет место между нейронами и астроцитами. Кроме того такая дифференциация связана с региональными особенностями, «блочным характером» функционирования отделов мозга, его зон и полей. В частности, не случайно, МТН-3 и его мРНК экспрессируются преимущественно в зонах с высокой концентрацией цинксодержащих везикулярных образований в таких регионах, как гиппокамп. В опытах на трансгенных мышах было показано, что МТН-3 функционирует как нейромодулятор, поставляя цинк в глутаматэргические синапсы и ионотропные глутаматные рецепторы. Освобождаемый МТН-3 цинк является регулятором катехоламиновых, глутаматных и ГАМК-рецепторов. Его низкие концентрации, как правило, являются активирующими, тогда как большие ингибируют и блокируют их. При сбое этого механизма происходит нарушение синаптической передачи и соотношение возбuditельно-тормозных процессов в наиболее активных зонах мозга. Не случайно, практически все виды нейроинтоксикаций ТМ характеризуются, в первую очередь, определенными поведенческими реакциями, нарушением когнитивных функций и аутизмом.

В последние годы в этом направлении достигнуты серьезные успехи. В частности, было показано, что при болезни Альцгеймера отмечается десятикратное снижение уровня МТН-3 и его мРНК в нейронах гиппокампа, цинкэргических нейронах и астроцитах. Этот факт коррелирует с нарушением укладки нейрофибрилл и появлением скоплений амилоида в измененных участках мозга. Указанные наблюдения связывают также с нарушениями гомеостаза цинка. Все вышеизложенное свидетельствует о сложности патогенеза болезни Альцгеймера, подтверждением чего служат следующие доказательства:

1. устойчивое снижение содержания цинка в тканях височной доли мозга;

2. повышение концентрации цинка в цереброспинальной жидкости;
3. существенное изменение соотношения свободного и связанного с МТН цинка в печени больных;
4. повышение активности внеклеточной цинк-металлопротеиназы в гиппокампе;
5. нейрохимический дефицит холинэргической деафферентации в гиппокампе при болезни Альцгеймера;
6. нарушение клеточного метаболизма цинка у людей с синдромом Дауна, который осложняется ранними изменениями, подобными болезни Альцгеймера;
7. такой известный хелатор цинка, как дезферриоксамин, оказывает положительное воздействие и препятствует прогрессированию болезни Альцгеймера;
8. b-амилоид – основной компонент амилоидных отложений при болезни Альцгеймера - активно связывает цинк, который повышает адгезивную способность образованных пептидов и их устойчивость к протеолитическому воздействию, способствуя тем самым развитию патогенетических изменений в каскаде реакций образования амилоида.

Подобные изменения метаболизма цинка и его гомеостаза в нервной системе наблюдаются при самых различных нейродегенеративных нарушениях, таких как болезни Паркинсона, Пика, Жиллиана-Барри, Вернике-Корсакова, амиотрофическом латеральном склерозе, эпилепсии, шизофрении, атаксии Фридриха, а также печеночной энцефалопатии и алкоголизме. Число таких патологических состояний достигло 40 и продолжает неуклонно возрастать. При всех этих видах поражений имеют место изменения, взаимосвязанные с уровнем МТН-3 (а частично и других изоформ) в головном мозге.

Большинство перечисленных нейродегенеративных поражений, синдромов и заболеваний встречаются преимущественно в пожилом и преклонном возрасте и отражают функциональные возрастные изменения в клеточном гомео-

стазе и взаимодействии регуляторных систем на различных уровнях функционирования ЦНС. Среди них наиболее важное значение придается оксидативному стрессу, который рассматривается как следствие недостаточности мозговых антиоксидантных систем, ассоциированных со снижением концентраций церебрального МТН. Важно подчеркнуть, что выход из МТН комплекса ионов, обладающих оксидативными свойствами, контролирует обмен цинка в системе тиолатных и дисульфидных радикалов. В этих случаях положительное преобладание восстановленных форм глутатиона в молодом возрасте имеет прямое и косвенное отрицательное воздействие на метаболизм цинка и гомеостаз МТН в мозгу. По аналогии с нейротоксичностью ТМ, оксидативный стресс индуцирует повреждение клеток за счет связывания свободных радикалов с МТН и снижения его антиоксидантных возможностей. При этом повышение содержания катехоламинов ингибирует процесс синтеза клетками МТН и снижает устойчивость клеток к оксидативному стрессу, что позволяет отнести основные нейродегенеративные заболевания к категории дисрегуляторных поражений. Это подтверждает также наличие регуляторной функции МТН в физиологии и патологии ЦНС.

Важность выполняемых МТН гомеостатических функций подтверждается зависимостью его индуктивного синтеза от экспрессии не менее трех различных генов. Это, по мнению Palmiter [787], имеет важные физиологические предпосылки:

1. наличие трех функционально эквивалентных генов позволяет осуществлять более быстрый и устойчивый синтез МТН в стрессорных условиях, чем если бы он кодировался одним геном (принцип резервирования);
2. кодирующие МТН гены могут регулироваться как идентично, так и дифференцированно, что позволяет осуществлять специфичную для разных типов клеток экспрессию МТН;
3. экспрессия разных генов обеспечивает дифференцированный синтез трех разных изоформ МТН, которые вы-

полняют присущие им генетически регламентированные функции.

Следовательно, важность и исключительность МТН как полифункционального сигнализатора, регулятора и эффектора имеет свое генетическое происхождение и обеспечение.

Анализ многочисленных и чрезвычайно разнородных источников информации по проблеме МТН, а также результаты собственных экспериментальных исследований позволяют постулировать этапность в накоплении данных по синтезу, метаболизму и функционированию этого уникального семейства низкомолекулярных белков в физиологии и патологии человека.

Первый этап изучения структуры и функций МТН базировался на представлениях о его транспортной функции в клетке и организме в целом. Поскольку речь шла о таких глобальных промышленных и экологических токсикантах, как кадмий, ртуть и мышьяк, исследователи изучали эпидемиологические особенности изменения содержания МТН у населения регионов с разными уровнями загрязнения среды обитания ТМ, а также наличие клинических признаков и биомаркеров вероятных токсических повреждений. На этом этапе была показана уникальность структуры МТН, а также изучены его биохимические и физиологические свойства на разнообразных экспериментальных моделях. Этот этап датируется 70-90 годами прошлого века и может быть охарактеризован как первично-познавательный. Основными функциями МТН были признаны его роль в транспорте ТМ и защите от оксидативного стресса. Обе функции рассматривались как взаимосвязанные.

Необходимо подчеркнуть, что доминирующее представление о МТН как транспортере ТМ сохраняет свои позиции до настоящего времени. Оно, в частности, доминирует в классической токсикологии металлов. Этому представлению в значительной мере обязано и название настоящей монографии.

Новый этап в изучении проблемы МТН начинается с

конца XX века. Уже в 90-х годах появились новые возможности для изучения синтеза клеточного гомеостаза МТН и его нарушений с использованием достижений геномики, протеомики, метаболомики и металломики, т.е. новых биологических технологий, основанных на достижениях биоинформатики, матриксных технологий и использовании трансгенных животных. Полученные данные не только существенно расширили наши представления о функциях МТН в физиологических и патологических условиях, но и привели к пересмотру некоторых, ставших «классическими» положений, касающихся характера наблюдаемых изменений и, особенно, их интерпретации. Это, в первую очередь, относится к месту и роли МТН в проблемах иммуно- и онкогенеза, клеточной смерти, а также установления его альтернативных (по отношению к транспортной) функций. К числу последних относятся сигнальная, нейромедиаторная и модулирующая процессы деления, роста, дифференциации клеток функции, а также дуализм в значимости индукции и ингибирования посттранскрипционной экспрессии МТН и его мРНК в растущих, стареющих и патологически измененных популяциях клеток. В этом плане есть основания полагать о наличии сигнальной функции МТН в межклеточных контактах и на популяционном клеточном уровне, что может определять направление прогрессивного пути развития клеточного роста, в частности по пути пролиферации либо симплификации и малигнизации.

Модулирующая активность МТН все больше ассоциируется с его участием в работе основных клеточных энергетических и биосинтетических циклов, физиологических процессов, имеющих каскадный характер, и реакциях, в которых принимают участие многочисленные реагенты и вспомогательные молекулы. В этом случае широкое взаимодействие МТН в процессе клеточного метаболизма с многочисленными активирующими, ингибирующими факторами, относящимися к различным классам и семействам белков теплового шока и антистрессорных, апоптозрегулирующих факторов, позволяет предположить наличие у МТН функций шаперона, обеспечивающего облегчение условий для протекания строго однонаправленных физиологических процессов в клетке. Это

касается его конформационных изменений, сопровождаемых импульсным выбросом свободного цинка, изменением степени металлизации в системе МТН/апоМТН, а также взаимодействие с такими ключевыми молекулами, как белок р53, МТФ, АТР, АТР-аза 7А, 7В, Са²⁺ и т.д.

Переход на новый этап изучения проблемы МТН выдвигает ряд новых вопросов, касающихся генетических, молекулярных и физиологических механизмов, позволяющих реализовывать столь многочисленные, многогранные и многозначные функции МТН. Неоспоримо доказанные факты проявления этим белком разнообразных протекторных свойств в клетке, тканях, органах и организме в целом ставят на повестку дня задачу разработки научных основ и соответствующих технологий для применения МТН в практике управления физиологическими функциями организма, а также лечения заболеваний, в патогенезе которых этому белку принадлежит важная роль. Благодаря таким технологиям может быть пересмотрен арсенал методов для лечения и профилактики микроэлементозов, ряда наследственных и приобретенных заболеваний, управления процессами эмбриогенеза, старения организма и решения других актуальных медико-биологических проблем.

Авторы уверены, что мы стоим у истоков третьего этапа развития проблемы металлотионеинов, который будет проходить под эгидой достижений современной геномики, молекулярной биологии и доказательной медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вернадский В. И. Биосфера и ноосфера /Вернадский В. И. М.: Айрис-Пресс – 2008. – 576 с.
2. David E. Metzler Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells. / 2nd Edition By David E. Metzler and Carol M. Metzler (Iowa State University). - New York: Academic Press - Volumes 1 and 2. - 2003. - 1973 p.
3. Биохимия человека. Т. 2. [Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл]. - М: Мир. – 2004. – 414 с.
4. Эйхорн Г. Неорганическая биохимия / Г. Эйхорн; пер. с англ. М. Е. Вольпина, К. Б. Яцимирского. – М.: Мир, 1978. – 711 с.
5. Кукушкин Ю. Н. Химические элементы в организме человека / Ю. Н. Кукушкин // Химия. Соросовский образовательный журнал. – 1998. - № 5. - С. 54–58.
6. Улахович Н. А. Комплексы металлов в живых организмах / Н. А. Улахович // Соросовский образовательный журнал. - 1997. - № 8. – С. 27-32.
7. Спозито Г. Распределение потенциально опасных следов металлов / Г. Спозито // В кн. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов / Под ред. Х. Зигеля, А. Зигель. – М.: Мир. - 1993. – С. 9-24.
8. “Handbook of Metalloproteins” /I. Bertini, A. Sigel and H. Sigel, eds. John Wiley & Sons, Ltd. 2001-2009 - 2039 P.
9. “Handbook on the Toxicology of Metals” / [Nordberg GF, Fowler VA, Nordberg M and Friberg L.] - [3rd edition] - Elsevier, 2007. - 992 P.
10. Оберлис Д. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных. / Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. – Спб: Наука, 2008. – 544 с.
11. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов / [Борисова Е.Я., Иванова Г.Ф., Калетина Н.И. и др.] под ред. проф. Н.И. Калетиной/ - М.: ГЭОТАР-Медиа - 2008. – 1016 С.
12. A series of books edited by Astrid, Helmut and Roland Sigel «Metal Ions in Life Sciences», Royal Society of Chemistry, Vol. 1-7
13. A series of books edited by Astrid, Helmut and Roland Sigel «Metal Ions in Biological Systems», Royal Society of Chemistry, VOL. 1-44
14. Cohen S.M. New approaches for medicinal applications of bioinorganic chemistry / S. M. Cohen // Curr. Opin. Chem. Biol. -

2007. – Vol. 11, No. 2. – P. 115-120.
15. Mounicou S. Metallomics: the concept and methodology / S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski // *Chem Soc Rev*. - 2009. – Vol. 38, No. 4. – P. 1119-1138.
 16. Микроэлементозы человека. / [Авцын А. Т., Жаворонков А. А., Риш М. А., Строчкова Л. С.] - М.: Медицина, 1991. - 497 с.
 17. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов / Под ред. Х. Зигеля, А. Зигель. – М.: Мир, 1993. – 368 с.
 18. Калетина Н. И. Биоконплексы микроэлементов – регуляторы метало-лигандного гомеостаза / Н. И. Калетина, Е. В. Арзамасцев, Е. Ю. Афанасьева// *Микроэлементы в медицине*. - 2002. - № 3 (1). - С.8-14.
 19. Скальный А.В. Микроэлементозы человека (диагностика и лечение): Практическое руководство для врачей и студентов медицинских вузов. / Скальный А.В. – М., 1999. – 96 с.
 20. Большой Д. В. Токсикокинетика и токсикодинамика кадмия и ртути / Д. В. Большой // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. - 2004. - № 1 (25). – С. 47-53.
 21. Большой Д. В. Связывание ионов ртути (II) белками *in vitro*. / Д. В. Большой, Е. Г. Пыхтеева, Л. М. Шафран // *Гігієна населених місць*. – 2004. - Выпуск 44 - С. 203-207.
 22. Пыхтеева Е. Г. Роль специфического транспорта тяжёлых металлов в механизмах токсического действия и процессах детоксикации/ Е. Г. Пыхтеева, Д. В. Большой // *Гігієна населених місць*. – 2006. - Выпуск 48. - С. 203-207.
 23. Свинец и здоровье человека (диагностика и лечение сатурнизма) / [Скальный А. В., Громова О. А., Есенин А. В., Скальная М. Г.] под ред. Акад. РАЕН А.А.Жаворонкова, член-корр. РАМН Е.М.Бурцева. - Иваново: Изд-во ИГМА – 1997. – (Руководство для врачей и студентов мед. Вузов)
 24. Тутелян В.А. Питание и процессы биотрансформации чужеродных веществ // В. А. Тутелян, Г. И. Бондарев, А. Н. Мартинчик // *Итоги науки и техники. ВИНТИ. Токсикология*/ - 1987. – Вып. 15. – С. 1-212.
 25. Биоэлементология: основные понятия и термины: терминологический словарь / А. В. Скальный, И. А. Рудаков, С. В. Нотова и др. - Оренбург: ГОУ ОГУ, 2005. – 50 с.
 26. Венчиков А. И. Биотики. / А. И. Венчиков- М.: Медгиз, 1962. - 234 с.
 27. Агаджанян Н.А. Химические элементы в среде обитания и эко-

ЛИТЕРАТУРА

- логический портрет человека / Н. А. Агаджанян, А. В. Скальный - М.: КМК, 2001. - 83 с.
28. Жолнин А. В. Биогенная химия (консп. лекций). /А. В. Жолнин - Челябинск: Изд-во ЧГМА, 2000. - 33с.
29. Москва В. В. Понятие кислоты и основания в органической химии / В. В. Москва // Соросовский Образовательный журнал. Химия. - 1996. - С.33-40.
30. Бгатов А.В. Биогенная классификация химических элементов. [Электронный ресурс] / А.В. Бгатов // Журнал "Философия науки". - 1999. - №2 (6). – режим доступа до журн.: http://www.water.ru/digest/biogen_classification.shtml
31. Экология и безопасность жизнедеятельности. / [Д. А. Кривошеин, Л. А. Муравей, Н. Н. Роева и др.]; под ред. Л. А. Муравья. - М: ООО "ИЗДАТЕЛЬСТВО ЮНИТИ-ДАНА", 2000 - 447 С.
32. Nieboer E. The replacement of the nondescript term 'heavy metal' by a biologically and chemically significant classification of metal ions /E. Nieboer and D. H. S. Richardson // Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical – 1980 – vol. 1, Issue 1 – P. 3-26
33. Израэль Ю. А. Экология и контроль состояния природной среды / Ю. А. Израэль – Л.: Гидрометеоиздат, 1979.— 376 с.
34. Решения Двадцать второй сессии Совета управляющих Программы Организации Объединенных Наций по окружающей среде/Глобальный форум по окружающей среде на уровне министров. Найроби, 3-7 февраля 2003 года Distr. GENERAL. UNEP/GC.22/6. 16 October 2002
35. Реймерс Н. Ф. Экология / Н. Ф. Реймерс - М.: Журнал «Россия Молодая», 1994 - 367 с.
36. Богдановский Г. А. Химическая экология / Г. А. Богдановский. М.: Изд. Моск. ун-та, 1994. - 237 с.
37. Скурлатов Ю. И. Введение в экологическую химию: Учеб. пособие для хим. и хим. -технолог. спец. вузов / Ю. И. Скурлатов, Г. Г. Дука, А. Мизити - М.: Высш. шк., 1994. — 400 с.
38. Майстренко В.Н. Эколого-аналитический мониторинг суперэкококксикантов / В. Н. Майстренко, Р. З. Хамитов, Г. К. Будников - М.: Химия, 1996. – 319 с.
39. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений./ Под ред. В.А. Абакумова. - Л.: Гидрометеоиздат, 1983. - 239 с.
40. Эйрих Алла Николаевна. Разработка метода оценки загрязненности рек тяжелыми металлами для системы экологического

- мониторинга : Дис.... канд. техн. наук : спец, 25.00.36 : Барнаул, 2003 120 с.
41. Капков В. И. Водоросли как биомаркеры загрязнения тяжелыми металлами морских прибрежных экосистем. Автореф. дис... д-ра. биол. наук, 03.00.18 / В. И. Капков - М., 2003 – 40 с. – рус.
 42. Засекін Д. А. Моніторинг важких металів у довкіллі та способи зниження їх надлишку в організмі тварин. Автореф. дис... д-ра вет. наук: 16.00.06 / Д. А. Засекін — К.: Нац. аграр. ун-т, 2002. — 40 с.
 43. Foulkes E. C. Transport of Toxic Heavy Metals Across Cell Membranes / E. C. Foulkes – Experimental Biology and Medicine - 2001. – VOL.223, № 3 – P. 234-241.
 44. Трахтенберг И.М., Тимофеевская Л.А., Квятковская И.Я. Методы изучения хронического действия химических и биологических загрязнителей / Отв. ред. И.М.Трахтенберг. – Рига, Зинатне, 1987. – 172 с.
 45. 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.
 46. Трахтенберг И. М. Книга о ядах и отравлениях: очерки токсикологии / И. М. Трахтенберг - К.: Наукова думка, 2000. - 966 с.
 47. Криштопенко С. В. Парадоксальная токсичность/ Криштопенко С. В., Тихов М. С., Попова Е. Б. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородской государственной медицинской академии, 2001. - 164 с.
 48. Шафран Л.М., Большой Д.В. Парадоксальная токсичность — интенсивно развивающееся направление современной токсикологии. II съезд токсикологов Украины / Л. М. Шафран, Д. В. Большой // Тезисы докладов II съезда токсикологов Украины, 12-14 октября 2004 года, Киев. – С. 17-18.
 49. Гжегоцький М. Р. Нариси профілактичної медицини / Гжегоцький М. Р., Федоренко В. І., Штабський Б. М. За ред. Б.М. Штабського. – Львів, 2008. – 400 с.
 50. Жолдакова З. И. Комплексное действие веществ. Гигиеническая оценка и обоснование региональных нормативов / Жолдакова З. И., Рахманин Ю. А., Синицына О. О. – М.: из-во ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН, 2006. – 243 с.

ЛИТЕРАТУРА

51. Metal-directed self-assembly of bimetallic dithiocarbamate transition metal cryptands and their binding capabilities / D Beer, G Berry, R Cowley [et al.] // *Chemical Communications* – 2003 – VOL. 12. – P. 2408-2409.
52. Толстых Е. И. Половозрастные особенности минерализации скелета у жителей радиоактивно загрязненных территорий Уральского региона : Дис.... д-ра биол. наук : 03.00.13 / Е. И. Толстых - Челябинск, 2006 - 317 с.
53. Kerper L. E. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier /L. E. Kerper, N. Ballatori, T. W. Clarkson // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* - 1992. – Vol. 262. – Iss. 8. – P. R761-R765.
54. Строев В.П. Токсикологические аспекты медико-биологических основ безопасности жизнедеятельности : [курс лекций] / В. П. Строев – Иваново – Р. Ив.гос.энергун-т – 2001 – 46 с.
55. Большой Д. В. Гігієнічне значення особливостей токсикокінетики, токсикодинаміки і біотрансформації малих доз ртуті : дис.... канд. биол. наук : спец. 14.02.01 / Д. В. Большой - К., 2007 – 167 с.
56. Экспериментальное обоснование системы биологической профилактики профессиональных свинцовых интоксикаций / Л. М. Шафран, А. М. Третьяков, Е. В. Третьякова [и др.] // *Гигиена труда.* – 2004. – Вып. 35. - С. 243-256.
57. Кундиев Ю.И., Трахтенберг И.М. Химическая опасность в Украине и меры по ее предупреждению // *Журн. АМН України* - 2004. - №2. – С. 259-267.
58. Metals associated with both the water-soluble and insoluble fractions of an ambient air pollution particle catalyze an oxidative stress / A. J. Ghio, J. Stonehuerner, L. A. Dailey [et al.] // *J. Inhal. Toxicol.* – 1999 – VOL. 11, N 1. – P. 37-49.
59. Salvi S. Mechanisms of particulate matter toxicity / S. Salvi, T. Holgate // *Clinical and Experimental Allergy* - 1999. – VOL. 29. – P. 1187–1194.
60. Szpunar J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics, heteroatom-tagged proteomics and metabolomics // *Analyst* - 2005. – Vol. 130, No. 5. – P. 442–465.
61. Shi W. Metallomics and metalloproteomics / W. Shi , M. R. Chance // *Cell Mol. Life Sci.* - 2008. – Vol. 65, Iss. 19. – P. 3040-3048.
62. Lalla Aicha Ba. Metal trafficking: from maintaining the metal

- homeostasis to future drug design / Lalla Aicha Ba, Mandy Doering, Torsten Burkholz and Claus Jacob // *Metallomics* – 2009 – Vol. 1 - P. 292 - 311
63. Mercer J. F. B. The molecular basis of copper transport diseases. / J. F. B. Mercer - *Trends Mol. Med.* - 2001. – Vol. 7. – P. 64–69.
64. Texel S.J. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases / Texel S.J., Xu X., Harris L. // *Biochem. Soc. Trans.* - 2008. – Vol. 36, Iss. 7. – P. 1277–1281.
65. Danks D. M. Disorders of copper transport. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* / Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. M. & Valle, D. eds. – 1995 - Vol. 1 - P. 2211–2235.
66. Elsenhans B. Toxic metals: interactions with essential metals. In: *Rowland IR (Ed). Nutrition, toxicity, and cancer* / Elsenhans B., Schymann K. and Forth W - London: CRC Press, Boca Raton, Ann. Arbor, Boston - 1991 - P. 223-258
67. Keen C. L.. Developmental changes in concentrations of iron, copper, and zinc in mouse tissues / C. L. Keen, L. S. Hurley // *Mech. Ageing DeVol.* -1980. – Vol. 13, No. 2. – P. 161-176.
68. Allen K. J. Chronological changes in tissue copper, zinc and iron in the toxic milk mouse and effects of copper loading/ K. J. Allen, N.E. Buck, D. M Cheah [et al.] // *Biometals* - 2006. – Vol. 19, Iss. 5. – P. 555-564.
69. Madsen E. Copper and iron disorders of the brain / E. Madsen, J. D.Gitlin // *Annu. ReVol. Neurosci.* - 2007. – Vol. 30, Iss. 4. – P. 317-337.
70. Collins J. F. Metabolic crossroads of iron and copper / J. F. Collins, J. R. Prohaska, M. D. Knutson // *Nutr. ReVol.* - 2010. – Vol. 68, No. 3. – P. 133-147.
71. Iron Transport and Storage in Microorganisms, Plants, and Animals – In: *Metal Ions in Biological Systems Volume 35* / Ed. by A. Sigel, H. Sigel. - New York: Marcel Dekker, 1988. - 775 p.
72. Causes and Consequences of Zinc Dyshomeostasis in Rats With Chronic Aldosteronism /Gandhi M. S., Deshmukh P. A., Kamalov G. [et al.] // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* - 2008. – Vol. 52, Iss. 3. – P. 245-252.
73. Изучение микроэлементного состава волос женщин в репродуктивном и пременопаузальном периодах / В. Н. Кустаров, И. И. Черниченко, В. Ю. Серпов и др. // *Российский вестник акушера-гинеколога* - 2003 - №4 – С. 23-25
74. Агаджанян Н. А. Химические элементы в среде обитания и

ЛИТЕРАТУРА

- экологический портрет человека / Н. А. Агаджанян, А. В. Скальный - [2-е изд.] - М.: изд-во КМК, 2001. - 83 с.
75. Основы клинической и аналитической токсикологии : [справочное руководство] / [В. М. Шейбак, Л. Ф. Панченко, В.А. Барышников и др] - М.: 2002 – 190 с.
76. Самохин В.Т. Гипомикроэлементозы -важнейшая экологическая проблема: материалы научно-практической конференции / Самохин В.Т., Бузлам В.С., Рецкий М. - Дубровицы, 1998. - С. 24-25.
77. Шафран Л. М. Гомеостаз тяжёлых металлов: гипотезы и реальность: тезисы докладов. / Л. М. Шафран, Е. Г. Пыхтеева, Д. В. Большой. // II Международная конференция «Гомеостаз: физиология, патология, фармакология и клиника». 28-29 сентября 2005 г. С. 5-11.
78. “ Справочник-путеводитель практикующего врача. 2000 болезней от А до Я / под ред. И. Н. Денисова , Ю. Л. Шевченко – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010 г. – 1328 с.
79. Murphy С.Ј. Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment / С. Ј. Murphy, G. Y. Oudit// J Card Fail. - 2010 – Vol. 16(11) – P. 888-900.
80. Медико-экологическая оценка риска гипермикроэлементозов у населения мегаполиса / [А. В. Скальный, А. Т. Быков, Е. П. Серебрянский и др.] – Оренбург: РИК ГОУ ОГУ, 2003. – 134 с.
81. Трахтенберг И.М. В биогеохимических провинциях жить можно, но.../ Исаак Трахтенберг – «Зеркало недели» - 2008 - № 14 (693), 12 — 18 апреля
82. Самохин В.Т. Гипомикроэлементозы -важнейшая экологическая проблема: материалы научно-практической конференции / Самохин В.Т., Бузлам В.С., Рецкий М. - Дубровицы, 1998. - С. 24-25.
83. Пыхтеева Е. Г. Регламентация вмісту мікроелементів в біосередовищах людини як актуальна екогігієнічна проблема/ Е. Г. Пыхтеева, Д. В. Большой // Материалы научно-практической конференции «Актуальні питання гігієни та екологічної безпеки України» (Перші марзеевські читання), 21-22 апреля 2005 года, г. Киев. - С. 181-182.
84. Скальный А.В. Биоэлементы в медицине / А. В. Скальный, И. А. Рудаков – М.: Издательский дом «Оникс 21 век», 2004. – 272 с.
85. Большой Д. В. Сравнительная характеристика влияния кадмия

- и ртути на процессы перекисного окисления липидов/ Д. В. Большой / III-і читання ім. В.В.Підвисоцького : [тезиси докладов научної конференції] (г. Одесса, 27-29 мая 2004 г.) - С. 21-22.
86. ДСанПІН 2.2.4-171-10 Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною
 87. ГН 2.1.5.689-98 Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования
 88. Большой Д. В. Тяжелые металлы – извечная проблема токсикологии/ Большой Д. В., Пыхтеева Е. Г., Шафран Л. М. // Здоровье и окружающая среда / Сборник научных трудов к 75-летию НИИ санитарии и гигиены. - Минск. - 2002. - С. 116-121.
 89. Велданова М. В. Йод знакомый и незнакомый. / М. В. Велданова, А. В. Скальный [изд, 2-е, дополненное]. - Петрозаводск: ИнтелТек, 2004. – 185 с.
 90. Гигиеническая диагностика загрязнения среды обитания солями тяжелых металлов / [Б. В. Лимин, В. Г. Маймулов, И.О. Мясников и др.] – Оренбург: РИК ГОУ ОГУ, 2003. – 122 с.
 91. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А. Овчинников - М. Просвещение, 1987. - 816 с.
 92. Гауровиц Ф. Химия и функции белков. / Ф. Гауровиц, пер. с англ. - М.: Мир, 1965. – 530 с.
 93. Химическая энциклопедия: В 5 т.: т. 1 / Редкол.: Зефиров Н. С. (гл. ред.) и др. – М.: Большая Российская энцикл., 1995. – 639 с.
 94. Агринская Н. В. Молекулярная электроника: [учеб. пособие] / Н. В. Агринская - СПб.: Изд-во СПбГПУ, 2004. - 110 с.
 95. Яцимирский К. Б. Биологические аспекты координационной химии / Яцимирский К. Б., Братушко Ю. И., Бударин Л. И. - Киев Наукова думка, 1979г. - 268 с.
 96. Букингем Д. А. Структура и стереохимия координационных соединений // Неорганическая биохимия [под ред. Эйхгорна Г.] - М.: Мир, 1978. - Т.1. - С. 17-88.
 97. Ангеличи Р. Дж.. Устойчивость координационных соединений. // Неорганическая биохимия [под ред. Эйхгорна Г.] - М.: Мир, 1978. - Т.1. – С. 89-129
 98. Джонс М.М., Хикс Дж.Э. Активация малых молекул при координации с металлами (пер. с англ.) // Неорганическая биохимия [под ред. Эйхгорна Г.] - М.: Мир, 1978. -Т. 1. С. 422-440.

ЛИТЕРАТУРА

99. Шамин А. Н. История биологической химии. Формирование биохимии / А. Н. Шамин – М.: Наука, 1983. - 262 с.
100. Костромина Н. А. Химия координационных соединений / Н.А. Костромина, В.Н. Кумок, Н.А. Скорик - М.: Высшая школа, 1990 – 432 с.
101. Якубке Х.-Д. Аминокислоты. Пептиды. Белки / Х.-Д.Якубке, Х.Ешкайт. - М.: Мир., 1985. - 456 С.
102. Тихомиров А. О. Характеристика білка гліальних проміжних філаментів головного мозку щурів за умов впливу іонів алюмінію та іонізуючого опромінення : дис... канд. біол. наук: 03.00.04 / Харківський національний ун-т ім. В.Н.Каразіна. - Х., 2005-164 с..
103. Effects of acute exposure to aluminum on cognition in humans / Molloy D. W., Standish T. I., Nieboer E. [et al.] // J. Toxicol. Environ. Health. A. – 2007 - Vol. 70(23) – P. 2011-2019.
104. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия / Ю. А. Овчинников - М.: Просвещение, 1987г. — 815с.
105. Esther Breslow. The Interaction of Ribonuclease with Metal Ions / Esther Breslow and Albert W. Girotti. // The Journal Of Biological Chemistry - 1966. – Vol. 41, No. 23 - P. 5651-5660
106. Morgan E. H. Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption / E. H. Morgan, P. S.Oates // Blood Cells Mol. Dis. – 2002. - Vol. 29(3) – P. 384-399.
107. Hcpidin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats/D. M. Frazer, S. J.Wilkins, E. M. Becker [et al.]// Gastroenterology - 2002. – Vol. 123(3) – P. 8358-844.
108. . Preparation and reactivity of a tetranuclear Fe(II) core in the metallothionein б-domain. / Sano Y., Onoda A., Sakurai R. [et al.] / J Inorg Biochem. - 2011 - № 105(5) – P.702-708.
109. Ferritin and metallothionein: dangerous liaisons. / Orihuela R., Fernбndez B., Palacios O. [et al.] // Chem Commun (Camb). - 2011 - № 47(44) – P. 12155-12157.
110. Anderson G. J. Recent advances in intestinal iron transport / G. J. Anderson, D. M. Frazer // Gastroenterol Rep. - 2005 – Vol. 7(5) – P. 365-372.
111. Oates P. S. The relevance of the intestinal crypt and enterocyte in regulating iron absorption / P. S. Oates // Pflugers Arch. - 2007. – Vol. 2455. - Iss. 2. – P. 201 - 213.
112. Нъсез М. Т. Regulatory mechanisms of intestinal iron absorption-

- uncovering of a fast-response mechanism based on DMT1 and ferroportin endocytosis/M. T. Nьсез // *Biofactors*. - 2010. - Vol. 36. - Iss. 2. - P. 88-97.
113. Wilson M. T. Oxygen-binding haem proteins / M. T. Wilson, B.J.. Reeder // *Exp Physiol*. – 2008- Vol. 93(1) – P. 128-132.
114. Shikama K. Nature of the FeO₂ bonding in myoglobin and hemoglobin: A new molecular paradigm / K. Shikama // *Prog Biophys Mol Biol*. - 2006 – Vol.91(1-2) – P. 83-162.
115. Василенко Ю.К. Биологическая химия. / Василенко Ю.К. - М.: Высш. шк., 1978 – 381 с.
116. Лубянова И. П. Современные представления о метаболизме железа с позиции профпатолога / И. П. Лубянова // *Актуальные проблемы транспортной медицины* – 2010 - № 2 (20) – С. 47-57.
117. Zhang A. S. Intracellular kinetics of iron in reticulocytes: evidence for endosomes involvement in iron targeting to mitochondria / A. S. Zhang, A. D. Sheftel, P. Ponka // *Blood*. - 2005. – Vol. 105. – Iss. 4. – P. 368-375.
118. Galatro A. Mitochondrial ferritin in animals and plants / A. Galatro, S. Puntarulo // *Biosci*. - 2007. – Vol. 1., N. 12. - P. 1063-1071.
119. Koulaouzidis A. Soluble transferrin receptors and iron deficiency, a step beyond ferritin. A systematic review / A. Koulaouzidis, E. Said, R. Cottier [et al.] // *J. Gastrointest. Liver Dis*. - 2009. – Vol. 18., N 3. – P. 345-352.
120. The Cellular Labile Iron Pool and Intracellular Ferritin in K562 Cells / A. M. Konijn, H. Glickstein, B. Vaisman [et al.] // *Blood* - 1999. – Vol. 94., N 6. – P. 2128-2134.
121. Arosio P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more / P. Arosio, R. Ingrassia, P. Cavadini // *Biochim. Biophys. Acta*. - 2009. – Vol. 1790, N 7. – P. 589-599.
122. Bridges K. R. The effects of ascorbic acid on the intracellular metabolism of iron and ferritin /K. R. Bridges, K. E. Hoffman // *J. Biol. Chem*. - 1986. – Vol. 261, Iss. 30. – P. 14273-14277.
123. Eisenstein R. S. Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism. / R. S. Eisenstein // *Ann. ReVol. Nutrition*. - 2001. – Vol. 20, Iss. 7. – P. 627-662.
124. Davis B.A. Results of long term iron chelation treatment with Deferoxamine / B. A. Davis, J. B. Porter // *AdVol. Exp. Med. Biol*. - 2002. – Vol. 509, N 1. – P. 91-125.
125. Ferritin and the response to oxidative stress / K. Orino, L. Lehman,

ЛИТЕРАТУРА

- Y.Tsuji [et al.] // *Biochem. J.* - 2001. - Vol. 357 (Pt. 1). – P. 241-247.
126. Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a non-classical secretory pathway / L. A. Cohen, L. Gutierrez, A. Weiss [et al.] // *Blood.* - 2010 – Vol. 116(9) – P. 1574-1584.
127. Arosio P, Levi S. Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage // *Biochim. Biophys. Acta*, 2010. – Vol. 1800. – Iss. 8. – P. 783-792.
128. Levi S. Mitochondrial ferritin / S. Levi, P. Arosio // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* - 2004. – Vol. 36. – Iss. 19. – P.1887–1889.
129. Неорганическая биохимия / под ред. Г.Эйхгорна, пер. с англ., том 1, М.: Мир, 1978
130. Balamurugan K. Copper homeostasis in eukaryotes: Teetering on a tightrope / K. Balamurugan, W. Schaffner // *Biochimica et Biophysica Acta* - 2006. – Vol. 1763. - P. 737–746.
131. Texel S. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases / S. J. Texel, X. Xu, L. Harris // *Biochem. Soc. Trans.* - 2008. – Vol. 36. – Iss. 7. – P. 1277–1281.
132. Llanos R. M. The molecular basis of copper homeostasis copper-related disorders / R. M. Llanos, J. F. Mercer // *DNA Cell Biol.* - 2002. – Vol. 21. – Iss. 4. – P. 259-270.
133. Valko M. Metals, toxicity and oxidative stress / M. Valko, H. Morris, M. T. Cronin // *Curr. Med. Chem.* - 2005. – No. 12. – P. 1161–1208.
134. Badarau A. Copper trafficking mechanism of CXXC-containing domains: insight from the pH-dependence of their Cu(I) affinities / A. Badarau, C. Dennison // *J Am Chem Soc.* - 2011 - № 133(9) – P. 2983-2988.
135. Rees E. M. Identification of a Vacuole-associated Metalloreductase and its Role in Ctr2-mediated Intracellular Copper Mobilization / Rees E.M., Thiele D.J. // *J. Biol. Chem.*, 2007. - Vol. 282, No. 30. – P. 21629–21638.
136. Bertinato J. Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-traffic proteins in response to copper deficiency or overload / J. Bertinato, M.R. L Abbe, // *J. Nutr. Biochem.* -2004. – Vol. 15. – P. 316–322.
137. Lalioti V. Molecular mechanisms of copper homeostasis / Lalioti V., Muruais G, Tsuchiya Y. // *Front Biosci.* - 2009. – Vol. 14. – P. 4878-4903.
138. Родимин Е. Металлоионотерапия. Лечение медью, серебром, золотом. /Е. Родимин // Изд. Рипол. 224 С.

139. Hellman N.E. Ceruloplasmin metabolism and function / N. E. Hellman, J. D. Gitlin // *Annu. Rev. Nutr.* - 2002. – Vol. 22. – Iss. 5. – P. 439–458.
140. Chakor R. T. Severe neuropsychiatric presentation of Wilson's disease / R. T. Chakor, N. S. Santhosh // *Indian J. Psychiatry*, 2011. – Vol. 53. – No. 2. – P. 170–171.
141. Copper incorporation into ceruloplasmin is regulated by Niemann-Pick C1 protein / Yanagimoto C, Harada M, Kumemura H. [et al.] // *Hepato Res.* - 2011 - № 41 (5) – P. 484-491.
142. Шейнберг И. Г. Церулоплазмин / И. Г. Шейнберг, А. Дж. Морелл. // *Неорганическая биохимия* [под ред. Эйхгорна Г.] - М.: Мир, 1978. - Т.1. - С. 361-376.
143. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов. / Под ред. проф. Н.И. Калетиной. М., ГЭОТАР : Медиа, 2008. - 1016 с.
144. Favorably skewed X-inactivation accounts for neurological sparing in female carriers of Menkes disease. / Desai V., Donsante A., Swoboda K. J., Martensen M., Thompson J., Kaler S. G. // *Clin Genet.* - 2011 – N 79(2) – P. 176-182.
145. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. / P de Bie, P Muller, C Wijmenga [et al.] // *J Med Genet* – 2007 - № 44. – P. 673–688.
146. Voskoboinik I. Menkes copper-translocating P-type ATPase (ATP7A): biochemical and cell biology properties, and role in Menkes disease. / I. Voskoboinik, J. Camakaris // *J Bioenerg Biomembr.* - 2002 - №34(5) – P. 363-371.
147. Effect of dietary copper deficiency on iron metabolism in the pregnant rat. / H. S. Andersen, L. Gambling, G. Holtrop [et al.] // *Br J Nutr.* - 2007 - № 97(2) - № 239-246.
148. [Abnormal copper metabolism in adult]. [Article in French] / Trocello M., Chappuis P., El Balkhi S. [et al.] // *Rev Med Interne.* - 2010 - № 31(11) – P. 750-756.
149. Prohaska J. R. Role of copper transporters in copper homeostasis. / J. R. Prohaska // *Am J Clin Nutr.* - 2008 - №88(3) - 826S-829S.
150. Hellman N. E. Ceruloplasmin metabolism and function. / N. E. Hellman, J. D. Gitlin // *Annu Rev Nutr.* – 2002 – Vol. 22 – P. 439 - 458
151. Yeh K. Y. Interactions between ferroportin and hephaestin in rat enterocytes are reduced after iron ingestion. / K. Y. Yeh, M. Yeh, J.

ЛИТЕРАТУРА

- Glass // *Gastroenterology*. - 2011 - Vol. 141(1) – P.292-299.
152. Maliken B. D. The hepcidin circuits act: balancing iron and inflammation./ B. D. Maliken, J. E. Nelson, K. V. Kowdley // *Hepatology*. - 2011 – Vol. 53(5) – P.1764-1766.
153. Metalloproteomics: high-throughput structural and functional annotation of proteins in structural genomics /W. Shi, C. Zhan, A. Ignatov [et al.] // *Structure*. - 2005 - Vol. 13(10) – P.1473-1486.
154. Shi W. Metallomics and metalloproteomics / W. Shi, M. R. Chance // *Cell Mol Life Sci*. – 2008 – Vol. 65(19) – P. 3040-3048.
155. Goyal K. Exploiting 3D structural templates for detection of metal-binding sites in protein structures / K. Goyal, S. C. Mande // *Proteins*. - 2008 – Vol. 70(4) –P. 1206-1218.
156. M. Margoshes. A cadmium protein from equine kidney cortex / M. Margoshes, B. L. Vallee. // *J. Am. Chem. Soc.* - 1957. - Vol. 79 (17). – P. 4813-4814
157. J. H. R. Кдgi Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex / J. H. R. Кдgiand, B. L. Vallee / *J. Biol. Chem.* - 1961. - Vol. 236. – P. 2435–2442.
158. M.Ваљак and G.Meloni. гл. 1 Metallothionein structure and reactivity в книге *Metallothioneins In Biochemistry And Pathology*, © World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., <http://www.worldscibooks.com/medsci/6663.html>
159. Sook-Jeong Lee. Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes. / Sook-Jeong Lee, Jae-Young Koh. // *Molecular Brain* – 2010.- Vol. 3. – P. 30-38.
160. Vallee B. L. The function of metallothionein / B. L. Vallee // *Neurochem. Int.* - 1995. – Vol. 27, N 1. – P. 23-33.
161. Maret W. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals / W. Maret // *Biomaterials* - 2009. – Vol. 22, N 1. – P. 149-157.
162. Ngu T. T. Metalation of metallothioneins. / T. T. Ngu, M. J. Stillman // *IUBMB* - 2009. – Vol. 61(4) – P. 438-446.
163. Luminescence emission from *Neurospora* copper metallothionein. Time-resolved studies / M. Beltramini, G. M. Giacometti, B. Salvato [et al.] // *Biochem. J.* - 1989. - Vol. 260, N 1. - P. 189-193.
164. X-ray absorption spectroscopy of cuprous-thiolate clusters in *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein / L. Zhang, I. J. Pickering, D. R. Winge [et al.]. // *Chem. Biodivers.* - 2008. – Vol. 5, N 10. – P. 2042-2049.

165. Vasbк M. Application of ^{113}Cd NMR to metallothioneins. / M. Vasbк // Biodegradation. – 1998 – Vol. 9(6) – P. 501-512.
166. Замятнин А. А.. Протоколы испытаний теории нового кода / А. А. Замятнин. // Природа – 1993 - № 5 - С. 65–66.
167. Comparison of the solution conformations of human [Zn7]-metallothionein-2 and [Cd7]-metallothionein-2 using nuclear magnetic resonance spectroscopy. / B. A. Messerle, A. Schdffer, M. Vasbк [et al.] // J Mol Biol. - 1992 - Vol. 225(2) – P. 433-443.
168. Nomenclature of metallothionein / B. A. Fowler, C. E.Hildebrand, Y. Kojima [et al.] //Experientia Suppl. – 1987. – Vol. 52 – P.21
169. Kojima Y. Definitions and nomenclature of metallothioneins / Y. Kojima // Meth. Enzymol. – 1991. - Vol. 205 – P. 8-10.
170. Binz P.-A. Metallothioneins – P. studies on molecular evolution and on the structural and chiroptical features of their metal thiolate clusters. / P.-A. Binz – PhD thesis, University Zurich, Switzerland – 1996.
171. Metallothionein: the multipurpose protein. / P. Coyle, J. C. Philcox, L. C. Carey [et al.] //Cell. Mol. Life Sci. – 2002. - Vol. 59 – P. 627–647.
172. Kagi J. H. Chemistry and biochemistry of metallothionein. / J. H. Kagi, Y. Kojima, // Experientia Suppl. – 1987. – Vol. 52 – P. 25–61.
173. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. / R. Dallinger, B. Berger, C. Gruber [et al.] // Cell. Mol. Biol. (Paris) - 2000. – Vol. 46 – P. 331–346.
174. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. / R. Dallinger, B. Berger, P. Hunziker [et al.] // Nature (London) - 1997. – Vol. 388 –P. 237–238.
175. Sens D.A. Metallothionein isoform 3 and renal cadmium toxicity / D.A. Sens– Crisp Data Base National Institutes of Health.
176. Roschitzki B. A distinct Cu(4)-thiolate cluster of human metallothionein-3 is located in the N-terminal domain. / B. Roschitzki, M. Vasak // J Biol Inorg Chem – 2002. – Vol. 7(6) – P.611-616.
177. Raman study of in vivo synthesized Zn(II)-metallothionein complexes: structural insight into metal clusters and protein folding. / A. Torreggiani, J. Dominech, S. Atrian [et al.] // Biopolymers. – 2008. – Vol. 89(12) – P. 1114-1124.
178. Metallothionein dimers studied by nano-spray mass spectrometry./ Y. Hathout , K. J. Reynolds, Z. Szilagyi [et al.]//J. Inorg. Biochem.

ЛИТЕРАТУРА

- 2002. – Vol. 15; №88(2) – P. 119-122.
179. Ryden L. Preparation and properties of the major copper-binding component in human fetal liver: its identification as metallothionein/ L. Ryden, H. F. Deutsch // *J. Biol. Chem.* - 1978. - Vol. 253. – P. 519–524.
180. Hepatic lysosomal copper protein in dogs with an inherited copper toxicosis / G. F. Johnson, A. G. Morell, R. J. Stockert [et al.] // *Hepatology* - 1981. - Vol. 1. – P. 243–248.
181. Stillman M. J. Metallothioneins/ M. J. Stillman // *Coord. Chem. Revol.* - 1995. – Vol. 144, No. 4. – P. 461–511.
182. Krezel A. Different redox states of metallothionein/thionein in biological tissue / A. Krezel, W. Maret // *Biochem. J.* - 2007. – Vol. 402. – Iss. 6. – P. 551–558.
183. Good M. Iron(II)-substituted metallothionein: evidence for existence of iron–thiolate clusters / M. Good, M. Ваљак // *Biochemistry.* - 1986. - Vol. 25. – P. 8353–8356
184. Macreadie Ian G. Copper transport and Alzheimer's disease/ Ian G. Macreadie // *European biophysics journal EBJ* – 2008. – Vol. 37, Iss. 3 - P. 295-300
185. Tapiero H. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. / H. Tapiero, K. D. Tew // *Biomed. Pharmacother.* – 2003. – Vol. 57 – P. 399–411
186. Wintz, H. Responses of plants to iron, zinc and copper deficiencies. / H. Wintz, T. Fox, C. Vulpe // *Biochem. Soc. Trans.* – 2002. – Vol. 30 - P. 766–768
187. Dreosti I. E. Zinc and the gene. / Dreosti I. E. // *Mutat Res.* - 2001 – Vol. 18, № 475(1-2) – P. 161-167.
188. Baraboi V. A. Metallothioneins: the structure and mechanisms of action. / V. A. Baraboi, L. G. Petrina // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 2003 – Vol. 75. P. 28–36.
189. Maret W. The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. / Maret W. // *J. Nutr.* – 2000 – Vol. 130. – P. 1455S–1458S.
190. Rakshit D. Studies on the assembly and stability of the metalthiolate clusters of metallothionein in dimethyl sulfoxide. / Rakshit, D. and Vasak, M. // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267 – P. 235–238.
191. Bernhard W. R. Cadmium binding and metal cluster formation in metallothionein: a differential modification study. / W. R. Bernhard, M. Vasak, J. H. Kagi, // *Experientia Suppl.* – 1987. – Vol. 52 – P. 243–246

192. Jacob C. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. / C. Jacob, W. Maret, B. L. Vallee // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1998. – Vol. 95 – P. 3489–3494.
193. Hussain S. Role of metallothionein and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection./ S. Hussain, Jr. W. Slikker, S. F. Ali, // Neurochem. Int. – 1996. – Vol. 29. – P. 145–152.
194. Maret W. Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair./ Maret W. // J. Nutr. – 2003. – Vol. 133 – P. 1460S–1462S19
195. Metallothionein can function as a chaperone for zinc uptake transport into prostate and liver mitochondria. / L. C. Costello, Z. Guan, R. B. Franklin [et al.] // J. Inorg. Biochem. – 2004. – Vol. 98 –P. 664–666
196. Stability and conformational dynamics of metallothioneins from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and mouse. / C. Capasso, O. Abugo, F. Tanfani [et al.] // Proteins - 2002. - Vol. 46 – P. 259–267.
197. Solution structure of MT nc, a novel metallothionein from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps*. / C. Capasso, VOL. Carginale, O. Crescenzi [et al.] // Structure (Camb.) – 2003. – Vol. 11- P. 435–443.
198. Phylogenetic divergence of fish and mammalian metallothionein: relationships with structural diversification and organismal temperature. / C. Capasso, VOL. Carginale, R. Scudiero [et al.] / J. Mol. Evol. – 2003. – Vol. 57 (suppl. 1) – P. S250–S257.
199. Zinc transfer potentials of the б- and в- clusters of metallothionein are affected by domain interactions in the whole molecule. / L. J. Jiang, M. Vasak, B. L. Vallee [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2000. – Vol. 97- P. 2503–2508.
200. Salgado M. T. Cu⁺ distribution in metallothionein fragments. / M. T. Salgado, M. J. Stillman // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2004 – Vol. 318 –P. 73–80.
201. Hepatic lysosomal copper protein in dogs with an inherited copper toxicosis / G. F. Johnson, A. G. Morell, R. J. Stockert [et al.] // Hepatology - 1981. - Vol. 1. – P. 243–248.
202. Maret W. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters / W.Maret, B. L. Vallee // Proc. Natl. Acad. Sci. USA - 1998. – Vol. 95, N 7. – P. 3478–3482
203. Yang Y. Differential fluorescence labelling of cysteinyl clusters uncovers high tissue levels of thionein / Y. Yang, W. Maret, B. L.

ЛИТЕРАТУРА

- Vallee // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 - 2001. – P. 5556–5559.
204. Вальбк М. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins. / М. Вальбк // Methods Enzymol. – 1991. – Vol. 205. P. 452–458.
205. Basal metallothionein in tumors: widespread presence of apoprotein. / A. Pattanaik, C. F. Shaw, D. H. Petering [et al.] // J. Inorg. Biochem. – 1994. – Vol. 54. – P. 91–105.
206. Haase H. A differential assay for the reduced and oxidized states of metallothionein and thionein. / H. Haase, W. Maret // Anal. Biochem - 2004. – Vol. 333 – P. 19–26.
207. Metallothionein disulfides are present in metallothionein-overexpressing transgenic mouse heart and increase under conditions of oxidative stress. / W. Feng, F. W. Benz, J. Cai, [et al.] // J. Biol. Chem. – 2006. – Vol. 281 – P. 681–687.
208. Baird S. K. Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization / S. K. Baird, T. Kurz, U. T. Brunk // Biochem. J. - 2006. - Vol. 394. – P. 275–283.
209. Pennie W. Toxicogenomics in Risk Assessment: An Overview of an HESI Collaborative Research Program / W. Pennie, S. D. Pettit, P.G. Lord // Environ Health Perspect. - 2004. – Vol. 112, No. 4. – P. 417-419.
210. New approaches to toxicologic mechanisms by the application of genomics, proteomics and metabolomics / C. Gerner, O. Teufelhofer, W. Parzefall [et al.] // Toxicology Letters, 2006. – Vol. 164. - Suppl. 1. – P. S3-S4. Abstr. EUROTOX 2006/6 CTDC Congress
211. Comparative metal binding and genomic analysis of the avian (chicken) and mammalian metallothionein / L. Villarreal, L. Tio, M. Merce' Capdevila [et al.] // FEBS Journal - 2006. – Vol. 273. – Iss. 6. – P. 523–535.
212. Chevalier S. Altered mRNA and protein expression in non-genotoxic hepatocarcinogenesis. / S. Chevalier, R. A. Roberts // Comments Toxicol - 2001.- Vol. 7- P.317–331.
213. The use of genomics technology to investigate gene expression changes in cultured human liver cells. / H. M. Harries, S. T. Fletcher, C. M. Duggan [et al.] // Toxicol In Vitro - 2001.- Vol. 15 – P. 399–405.
214. cDNA microarrays in investigative toxicology: a study of differential gene expression in compound induced cardiac hypertrophy. / P. G. Lord, K. A. Barne, K. Kramer [et al.] // Comments Toxicol. - 2001.

- Vol.7 - P. 381–392.
215. Morphologic analysis correlates with gene expression changes in cultured F344 rat mesothelial cells. / L. M. Crosby, K. S. Hyder, A. B. DeAngelo [et al.] // *Toxicol Appl Pharmacol* - 2000. - Vol. 169 – P. 205-222
216. Brooks A. N. Transcript profiling of the response to environmental hormone mimics. / A. N. Brooks, W. D. Pennie // *Comments Toxicol* – 2001. – №7 – P. 303-315
217. Toxicogenomics based discrimination of toxic mechanism in HepG2 human hepatoma cells. / M. E. Burczynski, M. McMillian, J. Ciervo [et al.] // *Toxicol Sci* – 2000. – Vol. 58 – P. 399–415.
218. Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity. / J. F. Waring, R. Ciurlionis, R. A. Jolly [et al.] // *Toxicol Lett* – 2001. - Vol. 120. – P. 359–368
219. Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. / H. K. Hamadeh, P. R. Bushel, S. Jayadev [et al.]. // *Toxicol Sci* – 2002. – Vol. 67. – P. 219–231
220. Avian metallothioneins: structure, regulation and evolution. / G. K. Andrews, L. P. Fernando, K. L. Moore [et al.] // *J Nutr* – 1996. – Vol. 126. – P. 1317S–1332S.
221. Weser U. Cadmium-induced synthesis of hepatic metallothionein in chicken and rats. / U. Weser, F. Donay, H. Rupp // *FEBS Lett* - 1973. – Vol. 32. – P. 171–174.
222. Characterization of Cd, Zn-Thionein (Metallothionein) isolated from rat and chicken liver. / U. Weser, H. Rupp, F. [et al.] // *Eur J Biochem* – 1973. – Vol. 39. – P. 127–140.
223. C. C. McCormick Amino acid sequence and comparative antigenicity of chicken metallothionein. // C. C. McCormick, C. S. Fullmer, J. S. Garvey // *Proc Natl Acad Sci USA* – 1988. - Vol. 85. – P. 309–313.
224. Wei D. Molecular cloning of chicken metallothionein. Deduction of the complete amino acid sequence and analysis of expression using cloned cDNA. / D. Wei, G. K. Andrews // *Nucleic Acids Res* – 1988. – Vol. 16 – P. 537–553.
225. Fernando L. P. Cloning and expression of an avian metallothionein-encoding gene. / L. P. Fernando, G. K. Andrews *Gene* – 1989. – Vol. 81. P. 177–183.
226. Fernando L. P. Structure and expression of chicken metallothionein. / L. P. Fernando, D. Wei, G. K. Andrews // *J Nutr*. – 1989. – Vol.

119. – P. 309–318.
227. Activation of the chicken metallothionein promoter by metals and oxidative stress in cultured cells and transgenic mice. / T. Dalton, B. C. Paria, L. P. Fernando [et al.] // *Comp Biochem Physiol.* – 1997. – Vol. 116. – P. 75–86.
228. Evolution of avian metallothionein: DNA sequence analyses of the turkey metallothionein gene and metallothionein cDNAs from pheasant and quail. / K. L. Shartzler, K. Kage, R. J. Sobieski [et al.] // *J Mol Evol* – 1993. –Vol. 36. - P. 255–262.
229. Structure and expression of metallothionein gene in ducks. / Y-L. Lee, Y-P. Chen, S-H. Wang [et al.] // *Gene.* – 1996. –Vol. 176. - P. 85–92.
230. Maxfield L. F. Relationship between retroviral DNA-integration-site selection and host cell transcription. / L. F. Maxfield, C. D. Fraize, J. M. Coffin // *Proc Natl Acad Sci USA* – 2005. – Vol. 102. – P. 1436–1441.
231. Lin L. Pigeon metallothionein consists of two species. / L. Lin, W. C. Lin, P. C. Huang *Biochim Biophys Acta* – 1990. – Vol. 1037. – P. 248–255.
232. Metallothionein expression under normal and pathological conditions: mechanisms of gene regulation based on in silico promoter analysis / D. Laukens, A. Waeytens, P. De Bleser [et al.] // *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* – 2009 - Vol. 19, No. 4 - P. 301–317.
233. Miura N. Heavy metal responses of the human metallothionein isoform genes / N. Miura, S. Koizumi // *Yakugaku Zasshi* – 2007. – Vol.127. – No. 4. - P. 665-673.
234. Andrews G. K. Regulation of metallothionein gene expression. / G. K. Andrews // *Prog Food Nutr Sci.* – 1990. – Vol. 14(2-3) – P. 193–258.
235. Induction of a New Metallothionein Isoform (MT-IV) Occurs during Differentiation of Stratified Squamous Epithelia / C. J. Quaife, S. D. Findley, J. C. Erickson [et al.] // *Biochemistry* – 1994. – Vol. 33. – P. 7250-7259.
236. Stuart G. W. Identification of multiple regulatory elements in mouse metallothionein-I promoter by assaying synthetic sequences. / G. W. Stuart, P. F. Searle, R. D. Palmiter. // *Nature* – 1985. – Vol. 317 – P. 828-831.
237. Cloning, chromosomal mapping and characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1. / E. Brugnera, O.

- Georgiev, F. Radtke [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 1994. –Vol. 22(15) – P. 3167–3173.
238. Davis S. R. Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function / S. R. Davis, R. J. Cousins // *J. Nutr.* - 2000. - Vol. 130. - No. 5. – P. 1085-1088
239. A 12-base-pair DNA motif that is repeated several times in metallothionein gene promoters confers metal regulation to a heterologous gene. / G. W. Stuart, P. F. Searle, H. Y.Chen [et al.] / *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1984. – Vol. 81(23). - P. 7318–7322.
240. Metallothionein in the central nervous system: roles in protection, regeneration and cognition /Adrian K. West, Juan Hidalgo, Donnie Eddins [et al.] / *Neurotoxicology.* - 2008 - № 29(3) – P. 488–502
241. Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. / F. Radtke, R. Heuchel, O. Hergersberg [et al.] // *EMBO J.* – 1993. – Vol.12 – P. 1355-1362.
242. Cloning, chromosomal mapping and characterization of the human metal-regulatory transcription factor MTF-1. / E. Brugnera, O. Georgiev, F. Radtke [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 1994.– VOL. 22 – P. 3167-3173.
243. Waldron K.J. Metalloproteins and metal sensing / Waldron K.J., Rutherford J.C., Ford D., Robinson N.J. // *Nature*, 2009.Vol. 460. – P. 823-830
244. Iron regulatory protein-1 and -2: transcriptome-wide definition of binding mRNAs and shaping of the cellular proteome by IRPs / Sanchez M, Galy B, Schwanhaeussler B[et al.] // *Blood.* 2011 Sep 22. [Epub ahead of print].
245. Lichtlen P.Putting its fingers on stressful situations – P. the heavy metal-regulatory transcription factor MTF-1. / P. Lichtlen, W. Schaffner // *Bioessays* – 2001.– vol. 23(11) – P. 1010-1017 – 2001.
246. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 1977. – Vol. 74 - P. 5463–5467.
247. Bartel D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function / D.P. Bartel // *Cell.* - 2004. - Vol. 116. – P. 281–297.
248. Leadon S. A. Differential repair of DNA damage in the human metallothionein gene family. / S. A. Leadon, M. M. Snowden. // *Mol. Cell. Biol.* - 1988. – Vol. 8. – P. 5331–5338.
249. Celltype specific and differential regulation of the human metallothionein genes. Correlation with DNA methylation and chromatin structure. / N. Jahroudi, R. Foster, H. J. Price [et al.] /

ЛИТЕРАТУРА

- / J. Biol. Chem. - 1990. – Vol. 265 – P. 6506–6511.
250. Sadhu C. Metal-specific posttranscriptional control of human metallothionein genes. / C. Sadhu, L. Gedamu. // Mol. Cell. Biol. – 1989 – Vol. 9 – P. 5738–5741.
251. Metallothionein mRNA induction in HeLa cells in response to zinc or dexamethasone is a primary induction response. / M. Karin, R. D. Andersen, E. Slater [et al.] // Nature. – 1980. – Vol. 286 – P. 295–297.
252. Metallothionein: the multipurpose protein./ P. Coyle, J. C. Philcox, L. C. Carey [et al.] // Cellular and Molecular Life Sciences. - 2002. - Vol. 59, N. 4. -P. 627–647.
253. Molecular cloning of human growth inhibitory factor cDNA and its down-regulation in Alzheimer's disease. / S. Tsuji, H. Kobayashi, Y. Uchida [et al.] // The EMBO Journal. - 1992. - Vol. 11, N 13. - P. 4843–4850.
254. Expression of MT-3 mRNA in human kidney, proximal tubule cell cultures, and renal cell carcinoma./ J. G. Hoey, S. H. Garrett, M. A. Sens [et al.] // "Toxicology Letters. - 1997. - Vol. 92, N 2. - P. 149–160.
255. Moffatt P. Expression of the gene encoding metallothionein-3 in organs of the reproductive system / P. Moffatt and C. Sreguin // DNA and Cell Biology – 1998. - Vol. 17, N 6. - P. 501–510.
256. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia / C. J. Quaife, S. D. Findley, J. C. Erickson [et al.] // Biochemistry/ - 1994. - Vol. 33, N 23. - P. 7250–7259.
257. Metallothionein overexpression suppresses hepatic hyperplasia induced by hepatitis B surface antigen. / C. J. Quaife, R. L. Cherne, T. G. Newcomb [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1999.– Vol. 155. – P. 107–116.
258. Leibbrandt M. E. Activation of human monocytes with lipopolysaccharide induces metallothionein expression and is diminished by zinc. / M. E. Leibbrandt, J. Koropatnick // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1994. – Vol. 124 – P. 72–81.
259. Yurkow E. J. Flow cytometric determination of metallothionein levels in human peripheral blood lymphocytes – P. Utility in environmental exposure assessment. / E. J. Yurkow, P. R. Makhijani // J. Toxicol. Environ. Health – 1998. – Vol. 54 – P. 445–457.
260. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. /R. D. Palmiter, S. D. Findley, T. E. Whitmore [et al.] //Proc. Natl.

- Acad. Sci. U.S.A.– 1992. – Vol. 89 – P. 6333–6337.
261. Lehman-McKeeman L. D. Induction of metallothionein-I and metallothionein-II in rats by cadmium and zinc. // L.D. Lehman-McKeeman, C.D. Klaassen // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1987.– Vol.88(2) – P. 195-202.
262. Bell S.G. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link /S. G. Bell, B. L. Vallee // *Chembiochem.* - 2009. – Vol. 10, N 1. – P. 55-62.
263. Interactions between Zn and Cu in LEC rats, an animal model of Wilson’s disease / A. Santon, S. Giannetto, C. Sturniolo [et al.] // *Histochem. Cell. Biol.*– 2002. – Vol. 117(3) – P. 275-281.
264. Quantification of Metallothionein Induced with Selenium by Using Competitive ELISA //Y. Liu, G. Jiang, B. Ru [et al.]. // *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* – 2002.– Vol. 34(2) – P.245-247.
265. Протективная роль церебролизин-индуцированной экспрессии генов металлотиионеина-I и металлотиионеина-II при церебральной очаговой ишемии у крыс / О.А. Громова, Н.Ю. Сотникова, С.И. Катаев [и др.]// *Цитокины и воспаление.* – 2005. - Т. 4, № 1. - С. 42-46.
266. Metallothionein-null mice are more sensitive than wild-type mice to liver injury induced by repeated exposure to cadmium. / S. S. Habeebu, J. Liu, Y. Liu [et al.] // *Toxicol. Sci.* – 2000.– Vol. 55 – P.223–232.
267. Induction of metallothionein in the liver of carbon tetrachloride intoxicated rats – P. an immunohistochemical study / S.E.Theocharis, A.P.Margeli, S.D.Skaltsas [et al.] // *Toxicology.* – 2001.– Vol. 161, № 1-2 - P. 129-138.
268. Exercise-induced metallothionein expression in human skeletal muscle fibres / M. Penkowa, P. Keller, C. Keller [et al.] // *Exp. Physiol.* – 2005.– Vol.90(4) –P. 477 – 486.
269. Sasagawa S, Stress-related induction of hepatic metallothionein synthesis and increase in peripheral polymorphonuclear leukocytes in mice. Sasagawa S, Matsubara J, Satow Y. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1993 Mar-Jun;15(2-3):217-26.
270. Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2 / Busfield SJ, Comrack CA, Yu G, et al. // *Genomics*, 2000. – Vol. 66. – No. 2. – P. 213-216
271. Kobayashi K, Himeno S, Satoh M, Kuroda J, Shibata N, Seko Y, Hasegawa T. Pentavalent vanadium induces hepatic metallothionein

ЛИТЕРАТУРА

- through interleukin-6-dependent and -independent mechanisms /
/ Toxicology, 2006. - 228(2-3):162-170.
272. Roles of copper chaperone for superoxide dismutase 1 and metallothionein in copper homeostasis. / T. Miyayama, Y. Ishizuka, T. Iijima [et al.] // Metallomics. 2011 - № 3(7) – P. 693-701.
273. Iszard M. B. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. / M. B. Iszard, J. Liu, C. D.Klaassen // – Toxicology – 1995. – Vol. 104. – P. 25–33.
274. Leibbrandt M. E. Activation of human monocytes with lipopolysaccharide induces metallothionein expression and is diminished by zin. // M. E. Leibbrandt, J. Koropatnick // Toxicol. Appl. Pharmacol. -1994. – Vol. 124 – P.72–81.
275. Blocking effect of anti-mouse interleukin-6 monoclonal antibody and glucocorticoid receptor antagonist, RU38486, on metallothionein-inducing activity of serum from lipopolysaccharide-treated mice // N. Itoh, K. Kasutani, N.Muto [et al.] // Toxicology. - 1996. - Vol. 112, N 1. - P. 29–36.
276. Morcillo M. A. Effect of gamma irradiation on liver metallothionein synthesis and lipid peroxidation in rats. / M. A. Morcillo, M. I. Rucandio, J. Santamaria //Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand) – 2000.– Vol. 46. – P.435–444.
277. Lack of metallothionein-I and -II exacerbates the immunosuppressive effect of ultraviolet B radiation and cis-urocanic acid in mice. / V. E. Reeve, N. Nishimura, M. Bosnic [et al.] // Immunology. – 2000.– vol. 100 – P.399–404.
278. Protection from radiation-induced DNA single-strand breaks by induction of nuclear metallothionein. / V. Vukovic, S. R. Pheng, A. Stewart [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. – 2000.– Vol. 76. – P.757–762.
279. Interferon alpha induction of metallothionein in rat liver is not linked to interleukin-1, interleukin-6, or tumor necrosis factor alpha / Guevara-Ortiz J. M., Omar-Castellanos V., Leyn-Chóvez B. A. [et al.] //Exp Mol Pathol. - 2005 - № 79(1) – P 33-38.
280. Sato M. Differential induction of metallothionein synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in rat tissues. / M. Sato, M. Sasaki, H.Hojo // Int. J. Immunopharmacol. -1994.– Vol.16. – P. 187–195.
281. De S. K. Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression / S. K. De, M. T. McMaster, G. K. Andrews // The Journal of Biological Chemistry - 1990. - Vol. 265, N 25. - P. 15267–15274.

282. Kotsonis F. N. Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agents. / F. N. Kotsonis, C. D. Klaassen // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1979.– Vol. 51 – P.19–27
283. Cousins R. J. Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin 1 / R. J. Cousins, A. S. Leinart // *The FASEB Journal.* - 1988. - Vol. 2, N 13. - P. 2884–2890.
284. Schroeder J. J. Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures / J. J. Schroeder, R. J. Cousins. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* - 1990. - Vol. 87, N 8. - P. 3137–3141.
285. Sato M. Differential induction of metallothionein synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in rat tissues. / M. Sato, M. Sasaki, H. Hojo // *International Journal of Immunopharmacology.* - 1994. - Vol. 16, N 2. - P. 187–195.
286. Ren Y. Mechanism of metallothionein gene regulation by heme-hemopexin—roles of protein kinase C, reactive oxygen species, and cis-acting elements // Y. Ren, A. Smith // *The Journal of Biological Chemistry.* - 1995. - Vol. 270, N 41. - P. 23988–23995.
287. Andrews G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. / G. K. Andrews. // *Biochemical Pharmacology.* - 2000. - Vol. 59, N 1. - P. 95–104.
288. Prion protein protects against zinc-mediated cytotoxicity by modifying intracellular exchangeable zinc and inducing metallothionein expression. / W. Rachidi, F. Chimienti, M. Aouffen [et al.] // *J. Trace Elem Med Biol.* – 2009. – Vol. 23(3) – P. 214–223.
289. Imbalance of the antioxidant network of mouse small intestinal mucosa after radiation exposure. // C. Haton, A. Francois, M. Vandamme [et al.] // *Radiation Research.* – 2007. - Vol. 167, N 4. - P. 445–453.
290. Kondoh M. Protective stress responsive protein – P. metallothionein]? / M. Kondoh, M. Sato // *Nippon Eiseigaku Zasshi* – 2002.– Vol. 56(4) – P. 634–640.
291. Общая токсикология // Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова – М.: Медицина, 2002 – 608 с.
292. Tian L. Metal-induced modulation of nitric oxide production in vitro by murine macrophages: lead, nickel, and cobalt utilize different mechanisms. / L. Tian, D. A. Lawrence // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1996. – Vol. 141. – P. 540–547.

ЛИТЕРАТУРА

293. Дмитруха Н. М. Імунотоксична дія свинцю і кадмію як гігієнічна проблема: Автореф. дис.. докт. біол. наук з спец. 14.02.01 – гігієна та проф. патологія. / Н. М. Дмитруха – К., 2011. – 40 с.
294. Bengazzi P. E. Metals and Kidney Autoimmunity / P. E. Bengazzi / *Envir. Health Perspect.* -1999. – Vol. 107. – Suppl. S. – P. 753-765.
295. Effects of physiological concentrations of heavy metals both individually and in mixtures on the viability and function of peripheral blood human leukocytes in vitro. / M. Fortier, F. Omara, J. Bernier [et al.] // *J Toxicol Environ Health* - 2008. – Vol. 71(19). – P. 1327-37.
296. Xiuyun Yin. Metallothionein mediates leukocyte chemotaxis/ Xiuyun Yin, David A Knecht, Michael A Lynes / *BMC Immunology* – 2005. – Vol. 6. P. 6-21.
297. Куценко С.А. Основы токсикологии: гл. 6.1. Иммунотоксичность. - СПб, 2002. – 570 С.
298. Di Gioacchino M. Immunotoxicity and sensitizing capacity of metal compounds depend on speciation / M. Di Gioacchino, N. Verna, L. Di Giampaolo // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* - 2007. – Vol. 2. - Suppl. 2. – P. 15-22.
299. Ohsawa M. Heavy metal-induced immunotoxicity and its mechanisms. / M. Ohsawa // *Yakugaku Zasshi.* - 2009. - Vol. 129. - No. 3. – P. 305-319.
300. Иммунология: В 3-х т. Т.1. Пер. с англ. / Под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1987-1988. – 476 с.
301. Descotes J. Immunotoxicology of cadmium. / J. Descotes // *IARC Sci Publ.* - 1992. – Vol. 118 – P. 385-390.
302. McCabe MJ Jr. Mechanisms and consequences of Immunomodulation by lead. - In: *Immunotoxicology and Immunopharmacology.*[2d ed] /Dean J. H., Luster M.I., Munson A. E., Kimber K. I., eds//. New York : Raven Press, 1994 – P. 143-162.
303. Immune factors, dental amalgam, and low-dose exposure to mercury in Swedish adolescents / P. Herrstrom, A. Holmen, A. Karlsson [et al.] // *Arch Environ Health* – 1994 - Vol. 49(3) – P. 160-164.
304. Haase H. The immune system and the impact of zinc during aging. // H. Haase , L. Rink / *Immun Ageing.* – 2009. – Vol. 6 – P. 6-9.
305. Zinc, metallothioneins and immunosenescence / E. Mocchegiani , M. Malavolta , L. Costarelli [et al.] / *Proc. Nutr. Soc.* - 2010. – Vol.

- 69, N 3. – P. 290-299.
306. Mocchegiani E. Metallothioneins/PARP-1/IL-6 interplay on natural killer cell activity in elderly: parallelism with nonagenarians and old infected humans. Effect of zinc supply./ E. Mocchegiani, M. Muzzioli , R. Giacconi // *Mech Ageing De* - 2003 - Vol. 124 (4) – P. 459-468.
307. Zinc, T-cell pathways, aging: role of metallothioneins. / E. Mocchegiani , M. Muzzioli , C. Cipriano [et al.] // *Mech Ageing De*. - 1998 - Vol.106 (1-2). –P. 183-204.
308. Zinc-bound metallothioneins and immune plasticity: lessons from very old mice and humans. / E. Mocchegiani, R. Giacconi , E. Muti [et al.] // *Immun Ageing*. - 2007 Vol. 4. – P. 7.
309. Cherian M. G. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. / Cherian M. G., A. Jayasurya, B.H. Bay // *Mutat Res*. – 2003. - Vol. 533(1-2). – P. 201-209.
310. Interaction of metallothionein with tumor suppressor p53 protein. / E. A. Ostrakhovitch, P. E. Olsson, S. Jiang [et al.] / *FEBS Lett*. - 2006 – Vol. 580(5) – P. 1235-1238.
311. Expression of metallothionein and p53 antigens are correlated in oral squamous cell carcinoma. / S. V. Cardoso, J. B. Silveira-Junior, V. De Carvalho Machado [et al.] // *Anticancer Res*. - 2009 – Vol. 29(4) – P. 1189-1193.
312. p53, p21 and metallothionein immunoreactivities in patients with malignant pleural mesothelioma: correlations with the epidemiological features and prognosis of mesotheliomas with environmental asbestos exposure. / R. Isik, M. Metintas, A. R.Gibbs [et al.] // *Respir Med*. -2001. – Vol. 95(7) – P. 588-593.
313. Puca R. Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutical implications in human cancer cells. / R. Puca, L. Nardinocchi, D. Givol, G. D'Orazi // *Oncogene*. - 2010 – Vol. 29(31) – P. 4378-4387.
314. Bitomsky N. Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling - roles of p53, p73 and HIPK2. / N. Bitomsky , T. G. Hofmann // *FEBS J*. - 2009 - Vol. 276(21) – P. 6074-6083.
315. Youn J,. Metallothionein-induced suppression of cytotoxic T lymphocyte function: an important immunoregulatory control. / J. Youn, M. A. Lynes. // *Toxicol Sci*. – 1999 - № 52(2) – P. 199-208.
316. Immunotoxicity and sensitizing capacity of metal compounds depend on speciation / M. Di Gioacchino, N. Verna, L. Di Giampaolo

- [et al.] // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* - 2007. – Vol. 2. - Suppl. 2. – P. 15-22.
317. Heo Y. In vivo the environmental pollutants lead and mercury induce oligoclonal T cell responses skewed toward type-2 reactivities. / Y. Heo, W. T. Lee, D. A. Lawrence // *Cell Immunol* – 1997. – Vol. 179 – P. 185–195.
318. Dietert R. R. Lead and immune function / R. R. Dietert, M. S. Piepenbrink // *Crit. Revol. Toxicol.* – 2006. – Vol. 36 – P. 359–385.
319. Reduction of myeloid suppressor cell derived nitric oxide provides a mechanistic basis of lead enhancement of alloreactive CD4(+) T cell proliferation / D. G. Farrer, S. Hueber, M. D. Laiosa [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 2008. – Vol. 229, No. 2. – P. 135-145.
320. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway / R. M. Bingisser, P.A. Tilbrook, P.G. Holt [et al.] / *J.Immunol.* – 1998 – Vol. 160. – P. 5729–5734.
321. Шевак И.М. Макрофаги и другие вспомогательные клетки. / Шевак И.М. // В кн.: *Иммунология: в 3-х т. Т. 1.* - Пер. с англ. / Под ред. У. Пола. – М.: Мир, 1987. – С. 115-172.
322. Reduced bactericidal activity and nitric oxide production in metallothionein-deficient macrophages in response to lipopolysaccharide stimulation / Norio Itoh, Hiroshi Shibayama, Masako Kanekiyo [et al.] // *Toxicology* – 2005 – Vol. 216 – P. 188–196.
323. Arginine: a thymotropic and wound-healing promoting agent. / A. Barbul, G. Rettura, S. M. Levenson [et al.] // *Surg Forum.* – 1977 – Vol. 28 – P. 101–103.
324. Arnold M. Nutrition and wound healing. / M. Arnold, A. Barbul // *Plast Reconstr Surg.* – 2006 – Vol. 117 Suppl 7 – P. 42–58.
325. Hibbs JB. Jr. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. / JB. Jr. Hibbs // *Res Immunol.* 1991 – Vol. 142 – P. 565–569.
326. Bogdan C. The role of nitric oxide in innate immunity. / C. Bogdan, M. Rollinghoff, A. Diefenbach // *Immunol Revol.* – 2000 – Vol. 173 – P. 17–26.
327. Production of nitric oxide during graft rejection is regulated by the Th1/Th2 balance, the arginase activity, and L-arginine metabolism. / V. Holan, J. Pindjakova, M. Krulova [et al.] // *Transplantation.* –

2006. – Vol. 81 – P. 1708–1715.
328. Regulation of arginase expression by T-helper II cytokines and isoproterenol. / A. R. Barksdale, A. C. Bernard, M. E. Maley [et al.] // *Surgery*. – 2004 – Vol. 135 – P. 527–535.
329. Arginine and Immunity / P. J. Popovic, H. J. Zeh, J. B. Ochoa // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137. –P. 1681S–1686S.
330. CD11b1/Gr-11 myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. / V. P. Makarenkova, V. Bansal, B. M. Matta [et al.] // *J Immunol.* – 2006 – V. 176 – P.2085–2094.
331. Serafini P. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. / P. Serafini, I. Borrello, V. Bronte // *Semin Cancer Biol.* – 2006 – Vol. 16 – P. 53–65.
332. Kusmartsev S. Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. / S. Kusmartsev, D. I. Gabrilovich // *Cancer Immunol Immunother.* – 2006 – Vol. 55 – P. 237–245.
333. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. / C. R. Morris, G. J. Kato, M. Poljakovic [et al.] // *JAMA.* – 2005. – Vol. 294. – P. 81–90.
334. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. / E. I. Closs, J. S. Scheld, M. Sharafi [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2000 – Vol. 57 –P. 68–74.
335. Apolipoprotein E acts to increase nitric oxide production in macrophages by stimulating arginine transport. / C.A. Colton, M. Czapiga, J. Snell-Callanan [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta/* - 2001.- Vol. 1535 – P. 134–144.
336. . Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. / M. A. Schwarz, J. S. Lazo, J. C. Yalowich [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 1995 – Vol. 92 – P. 4452–4456.
337. Metallothionein is required for zinc-induced expression of the macrophage colony stimulating factor gene. / M. Kanekiyo, N. Itoh, A. Kawasaki [et al.] // *Cell. Biochem.* – 2002. – Vol. 86 –P. 145–153.
338. Nitric oxide mediated metallothionein induction by lipopolysaccharide. / K. Arizono, S. Kagawa, H. Hamada // *Mol. Pathol. Pharmacol.* - 1995. – Vol. 90 – P. 49–58.
339. Aravindakumar C. T. Nitric oxide induces Zn²⁺ release from

- metallothionein by destroying zincsulphur clusters without concomitant formation of S-nitrosothiol. / C. T. Aravindakumar, J. Ceulemans, M. De Ley // *Biochem. J.* - 1999. – Vol. 344 – P. 253–258.
340. Nitric oxide induces metallothionein (MT) gene expression apparently by displacing zinc bound to MT. / K. Katakai, J. Liu, K. Nakajima [et al.] // *Toxicol. Lett.* - 2001. – Vol. 119. – P. 103–108.
341. Metallothionein modulates lipopolysaccharide-stimulated tumour necrosis factor expression in mouse peritoneal macrophages. / M. Kanekiyo, N. Itoh, A. Kawasaki [et al.] // *Biochem. J.* - 2002 – Vol. 361 – P. 363–369.
342. Roles of copper chaperone for superoxide dismutase 1 and metallothionein in copper homeostasis / T. Miyayama, Y. Ishizuka, T. Iijima [et al.] // *Metallomics.* - 2011 - Mar 15. [Epub ahead of print]
343. Дрцге W. Free radicals in the physiological control of cell function / Дрцге W. // *Physiol. Rev.*, 2002. – Vol. 82. – No. 1. – P. 47-95.
344. Ю. І. Губський. Біологічна хімія: Підручник. / Ю. І. Губський // Київ-Тернопіль:Укрмедкнига, 2000. – 508 с
345. 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.
346. 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.
347. 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.
348. Eck P. Induction of metallothionein by exposure to normobaric 100% oxygen atmosphere in rats with different zinc supply. / P. Eck, J.Pallauf // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2001 – Vol. 15(4) – P. 229-235.
349. Iszard M.B. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats / M. B. Iszard, J. Liu, C. D. Klaassen // *Toxicology* – Vol. 104, № 1-3 – P. 25-33 – 1995.
350. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse – P. MTF-1/metallothioneins and glutathione / Ursula Wimmer, Ying Wang, Oleg Georgiev [et al.] // *Nucleic Acids Research* – 2005. –

- № 33(18) – P. 5715-5727.
351. An K. W. Physiological responses and expression of metallothionein (MT) and superoxide dismutase (SOD) mRNAs in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to benzo[a]pyrene / K. W. An, H. S. Shin, C. Y. Choi // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* - 2008 - №149(3) – P. 534-539.
352. p53 antibodies, metallothioneins, and oxidative stress markers in chronic ulcerative colitis with dysplasia. / Hamouda H. E., Zakaria S. S., Ismail S.A. [et al.].// *World J. Gastroenterol.* - 2011 - № 17(19) – P. 2417-2423.
353. You H.J. Overexpression of human metallothionein-III prevents hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human fibroblasts. // H. J. You, K. J. Lee, H. G. Jeong // *FEBS Lett.* – 2002. – Vol.521(1-3) – P.175-179.
354. Возможный механизм противолучевого эффекта металлотиионеина: стимуляция репликативного синтеза ДНК и пролиферации клеток костного мозга / А. Н. Котеров, З. А. Требенюк, Н. Б. Пушкарева [и др.] // *Радиц. биология. Радиоэкология.* - 1998. -Т. 38, вып. 3. - С. 432-437.
355. Никольский А.В. Показатели пролиферативной активности клеток кроветворных органов у мышей, защищенных от излучения индралином в сочетании с Zn-металлотиионеином / А. В. Никольский, Н. Б. Пушкарева, А. Н. Котеров // *Радиационная биология. Радиоэкология* - 2001.-N 4.-С.378-384
356. Котеров А.Н. Радиоадаптивный ответ *in vitro* нестимулированных лимфоцитов крыс по металлотиионеиновому тесту // А. Н. Котеров, И. В. Филиппович // *Радиационная биология. Радиоэкология* - 2002.-N 2.-С.130-135.
357. Metallothionein in radiation exposure – P. its induction and protective role / L. Cai, M. Satoh, C. Tohyama [et al.].// *Toxicology.* – 1999.– Vol. 132, № 2-3 – P. 85-98
358. Increased radiation-induced apoptosis in mouse thymus in the absence of metallothionein / D. X. Deng, L. Cai, S. Chakrabarti [et al.] // *Toxicology.* – 1999.–Vol. 134, № 1 – P. 39-49
359. Miura N., Satoh M., Imura M., And Naganuma A. Protective Effect of Bismuth Nitrate Against Injury to the Bone Marrow by g-Irradiation in Mice: Possible Involvement of Induction of Metallothionein Synthesis // *J. Pharmacol. Exp. Ther. (JPET)*, 1998. – Vol. 286. – P. 1427–1430.
360. Oxidative stress and metallothionein expression in the liver of rats with severe thermal injury / H.Q. Ding, B.J. Zhou, L. Liu [et al.] //

ЛИТЕРАТУРА

- Burns. – 2002.– Vol. 28(3) – P.215-21.
361. Protective effects of Zn-metallothionein on erythrocyte membrane of rats with severe scalding after delayed resuscitation / F. Qin, X. Chen, H. Ding [et al.] // [Zhonghua Wai Ke Za Zhi – 2002. - Vol. 40(3) – P. 222-224.
362. Suzuki Y. Astrocyte cultures from transgenic mice to study the role of metallothionein in cytotoxicity of tert-butyl hydroperoxide / Y. Suzuki, M. D. Apostolova, M. G. Cherian // Toxicology – 2000. – Vol. 145, №1- P. 51-62
363. McAleer M.F. Metallothionein protects against severe oxidative stress-induced apoptosis of human trophoblastic cells. / M. F. McAleer, R. S. Tuan // In Vitro. Mol. Toxicol. – 2001.– Vol. 14(3) – P. 219-231.
364. Metallothionein – P. the multipurpose protein. /P. Coyle, J. C. Philcox, L.C.Carey [et al.] // Cell. Mol. Life Sci. – 2002.– №59(4) – P.627-647.
365. Zhou Z. Metallothionein Protection against Alcoholic Liver Injury through Inhibition of Oxidative Stress. / Z. Zhou, X. Sun, K. James // Exp Biol Med (Maywood) - 2002 – Vol. 227(3) – P. 214-22.
366. Modulation of nitric oxide-mediated metal release from metallothionein by the redox state of glutathione in vitro / Leila Khatai, Walter Goessler, Helena Lorencova [et al.] // Eur. J. Biochem. – 2004. – Vol. 271 – P. 2408-2416.
367. Nitric Oxide and Zinc Homeostasis in Acute Lung Injury / C. M. St. Croix, K. Leelavaninchkul, S. C. Watkins [et al.] // Proceedings of the ATS. – 2005. – Vol. 1, №2(3). – P. 236 – 242
368. James Kang Y. The Antioxidant Function of Metallothionein in the Heart / Y. James Kang. // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine -- 1999. - Vol. 222 – P.263-273.
369. Overexpression of Metallothionein in the Heart of Transgenic Mice Suppresses Doxorubicin Cardiotoxicity /Y. James Kang, Yan Chen, Anding Yu [et al.] // J. Clin. Invest. – 1997.– Vol. 100, № 6 – P.1501-1506
370. S-glutathionylation of metallothioneins by nitrosative/oxidative stress. / M. Casadei, T. Persichini, F. Polticelli [et al.] // Exp Gerontol. – 2008. – Vol. 43(5) – P. 415-422.
371. Regulatory role of metallothionein in NF-kappaB activation. / A. Sakurai, S. Hara, N. Okano [et al.] //FEBS Lett. – 1999. – Vol. 455(1-2) – P. 55-58.

372. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / [Е. Б. Меньшикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др.] - М.: Фирма "Слово", 2006. – 554 с.
373. S-Nitrosothiols React Preferentially with Zinc Thiolate Clusters of Metallothionein III through Transnitrosation / Y. Chen, Y.Irie, W. M. Keung [et al.] // *Biochemistry* – 2002.– Vol. 2; №41(26) – P.360-367.
374. Inhibition of Superoxide Generation and Associated Nitrosative Damage Is Involved in Metallothionein Prevention of Diabetic Cardiomyopathy / L. Cai, J. Wang, Y. Li, [et al.] / *Diabetes*. – 2005. - Vol.54(6) – P.1829 – 1837.
375. Overexpression of Metallothionein Reduces Diabetic Cardiomyopathy / Qiangrong Liang, Edward C. Carlson, Rajakumar V. Donthi, Patricia M. Kralik [et al.] // *Diabetes*. – 2002.– Vol. 51 – P.174-181.
376. Ceylan-Isik A. F. Sex difference in cardiomyocyte function in normal and metallothionein transgenic mice – P. the effect of diabetes mellitus / A. F. Ceylan-Isik, K. H. LaCour, J. Ren // *J. Appl. Physiol* – 2006.– Vol.100(5) –P. 1638-1646.
377. Ayaz // Selenium prevents diabetes-induced alterations in [Zn²⁺]i and metallothionein level of rat heart via restoration of cell redox cycle. /Ayaz and B. Turan // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2006.– Vol. 290(3). – P.1071 – 1080.
378. Cardiac Metallothionein Induction Plays the Major Role in the Prevention of Diabetic Cardiomyopathy by Zinc Supplementation/ J. Wang, Y. Song, L. Elsherif, [et al.] /*Circulation*. – 2006.– Vol. 113(4) –P. 544 – 554.
379. Metallothionein-Mediated Antioxidant Defense System and Its Response to Exercise Training Are Impaired in Human Type 2 Diabetes / C. Scheede-Bergdahl, M. Penkowa, J. Hidalgo [et al.] // *Diabetes*. – 2005. – Vol. 54(11) – P.3089-3094.
380. Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. / J. Zeng, R. Heuchel, W. Schaffner [et al.]//*FEBS Lett.* - 1991 – Vol. 279(2) – P. 310-312.
381. Антонов В.Ф. //Мембранный транспорт – Соросовский образовательный журнал. Биология. – 1997 г.
382. Eide D. J. Metal ion transport in eukaryotic microorganisms – P. insights from. / D. J. Eide // *Advances in Microbial Physiology*. – 2000 – Vol. 43. – P 1-38.

ЛИТЕРАТУРА

383. Foulkes E. C. Interactions between metals in rat jejunum – P. Implications on the nature of cadmium uptake. / Foulkes E. C. // *Toxicology* – 1985. – Vol.37 – P.117-125.
384. Eide D. J. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. / D. J. Eide // *Annual Review of Nutrition*.- 1998. -Vol. 18. – P. 441-469.
385. Askwith C. C. T Molecular biology of iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*.// C. C. Askwith, D. de Silva, J. Kaplan // *Molecular Microbiology*. – 1996. – Vol. 20, N 1. – P 27-34. – 1996
386. Agbas A, Hui D, Wang X, Tek V, Zaidi A, Michaelis EK. Activation of brain calcineurin (Cn) by Cu-Zn superoxide dismutase (SOD1) depends on direct SOD1-Cn protein interactions occurring in vitro and in vivo // *Biochem. J.*, 2007. – Vol. 405. – No. 1. – P. 51-59.
387. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease / Duce J.A., Tsatsanis A., Cater M.A. et al. // *Cell*, 2010 – Vol.142. – No. 6. - P. 857-867.
388. OsMT1a, a type 1 metallothionein, plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. / Z. Yang, Y. Wu, Y. Li [et al.] // *Plant Mol Biol*. – 2009. – Vol. 70(1-2) – P. 219-229.
389. Shen H. Cooperation of metallothionein and zinc transporters for regulating zinc homeostasis in human intestinal Caco-2 cells. / H. Shen, H. Qin, J. Guo // *Nutr Res*. - 2008 - Vol.28(6) – P. 406-413.
390. Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis / R.A. Colvin , W. R. Holmes , C. P. Fontaine [et al.] / *Metallomics*. - 2010 - № 2(5) – P. 306-317.
391. Maret W. Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. / W. Maret // *J Biol Inorg Chem*. - 2011 – № 16(7). – P. 1079-1086.
392. Скальная М. Г. О пределах физиологического (нормального) содержания Ca, Mg, P, Fe, Zn и Cu в волосах человека. / М. Г. Скальная, В. А. Демидов, А. В. Скальный // *Микроэлементы в медицине*. - 2003. – Т.4., Вып.2. - С.5–10.
393. Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in Mammalian eggs. / Kim A.M., Bernhardt M.L., Kong B.Y. [et al.] // *ACS Chem Biol*. - 2011 - № 6(7) – P. 716-723.
394. Interference by toxic metal ions with zinc-dependent proteins involved in maintaining genomic stability./ A. Hartwig, M. Asmuss, H. Blessing [et al.] // *Food. Chem. Toxicol.*– 2002. – Vol.40(8) – P.1179-1184.
395. Interaction of dietary zinc and intracellular binding protein metallothionein in postnatal bone growth. / L. Fong, K. Tan , C. Tran

- [et al.] // Bone. – 2009. – Vol. 44(6) – P. 1151-1162.
396. Oxidative stress in the pathogenesis of canine zinc-responsive dermatosis. / M. Romanucci, L. Bongiovanni, A. Russo [et al.] // Vet Dermatol. – 2010. – Vol. 22 – P. 31-38.
397. Beyersmann D. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. / D. Beyersmann, H. Haase // Biometals. – 2001. – Vol. 14(3-4). - P. 331-341.
398. Gaither L. A. / Eukaryotic zinc transporters and their regulation. / L. A. Gaither, D. J. Eide // Biometals.– 2001. – Vol. 14(3-4) – P.251-270.
399. Santon A. The influence of metallothionein on exposure to metals: an in vitro study on cellular models / A. Santon, A. Formigari, P. Irato // Toxicol In Vitro. – 2008. – Vol. 22(4) – P. 980-987.
400. Zinc homeostasis in pediatric critical illness / N. Z. Cvijanovich, J. C. King, H. R. Flori [et al.] // Pediatr Crit Care Med. – 2009. – Vol. 10(1) – P. 29-34.
401. Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) is essential for embryonic liver development and heavy metal detoxification in the adult liver. / Y. Wang, U. Wimmer, P. Lichtlen [et al.] // FASEB J. – 2004. – Vol. 18. P. 1071–1079.
402. Beyersmann D. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. / D. Beyersmann, H. Haase // Biometals – 2001. –Vol. 14(3-4) – P. 331-341
403. Krezel A. The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling. / A. Krezel, Q. Hao, W. Maret // Arch Biochem Biophys. – 2007. - № 463(2) – P. 188-200.
404. Metallothionein as an anti-inflammatory mediator / K. Inoue, H. Takano, A. Shimada [et al.] // Mediators Inflamm. - 2009. – P. 101659.
405. Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule / T. Hirano, M. Murakami, T. [et al.] // Adv Immunol. – 2008 – Vol. 97 – P. 149-176.
406. Haase H. Signal transduction in monocytes: the role of zinc ions. / H. Haase, L. Rink // Biometals. - 2007. – Vol. 20, N 3-4. – P. 579-585.
407. G.Roesijadi// Metal transfer as a mechanism for metallothionein-mediated metal detoxification – Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) – VOL. 46, № 2 – P. 393-405 – 2000.
408. King J. C. Zinc: an essential but elusive nutrient. / J. C. King // Am

ЛИТЕРАТУРА

- J Clin Nutr. - 2011 - № 94(2) – P. 679S-684S.
409. Jiang L.-J. The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase / Li-Juan Jiang, Wolfgang Maret, Bert L. Vallee // *Biochemistry* – 1998. - Vol. 95, Issue 7. – P. 3483-3488.
410. Targeting of Metallothionein by L-Homocysteine. A Novel Mechanism for Disruption of Zinc and Redox Homeostasis. / John C. Barbato; Otilia Catanescu; Kelsey Murray[et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. -2007.- P. 27-49
411. Jiang L.-J. ATP -комплекс металлотионеина. / L.-J.Jiang, W. Maret, B. L. Vallee // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1998– P. 9146-9149.
412. The ATP/Metallothionein Interaction – P.[?] NMR and STM. / W. Maret, G. Heffron, H. A. Hill [et al.] // *Biochemistry* – 2002. – Vol.5; №41(5) – P.1689-1694
413. Zinc, metallothioneins and longevity: interrelationships with niacin and selenium / E. Mocchegiani, M. Malavolta, E. Muti [et al.] // *Curr. Pharm. Des.* - 2008. – Vol. 14., Iss. 26. – P. 2719-2732.
414. Zinc, metallothioneins, and longevity—effect of zinc supplementation: zincage study / E. Mocchegiani, R. Giacconi, C. Cipriano [et al.] // *NY Acad Sci.* – 2007. – Vol. 1119 – P. 129-146
415. Mocchegiani E. Zinc–gene interaction related to inflammatory/immune response in ageing / E. Mocchegiani, M. Malavolta // *Genes Nutr.* - 2008. – Vol. 3 (2). – P. 61-75.
416. Protein and metal cluster structure of the wheat metallothionein domain γ -E(c)-1: the second part of the puzzle. / Loebus J., Peroza E. A., Blythgen N. [et al.] // *J Biol Inorg Chem.* - 2011 - № 16(5) – P. 683-694.
417. Edmond H. Fischer. Recent excitement regarding metallothionein. / Edmond H. Fischer and Earl W. Davie// *PNAS* March 31 – 1998 - vol. 95, №. 7 – P. 3333-3334
418. Analysis of tissue cadmium distribution in chronic cadmium-exposed mice using in-airmicro-PIXE. / T. Nagamine, K. Nakazato, K. Suzuki [et al.] // *Biol Trace Elem Res.* - 2007 - № 117(1-3) – P. 115-126.
419. Quantification of oxidized metallothionein by a Cd-saturation method. /D. Klein,U. Arora , S. Sato, Summer K. H.//*Methods Mol Biol.* – 2002. –Vol. 186. – P. 285-291.
420. Dieter H. H. Metallothionein-determination in biological materials: interlaboratory comparison of 5 current methods. / H. H. Dieter, L.

- Мыллер, J. Abel [et al.] // *Experientia Suppl.* – 1987. – Vol. 52 – P. 351-358.
421. Eaton D. L. A simplified method for quantitating metallothionein in biological tissues. / D. L. Eaton, B. F. Toal // *Sci. Total Environ.* – 1983. – Vol. 28. – P. 375-384.
422. Патент України на корисну модель № 60439 А УА, 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
423. Messerle B. A. Three-dimensional structure of human [113Cd7]metallothionein-2 in solution determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. / B. A. Messerle, A. Schdffer, M. Vasbк [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1990. - Vol. 214(3) – P. 765-779.
424. Алексеев И.О. Аналитическая химия. /Алексеев И.О. - М.: Наука, 1988. – 689 с.
425. Induction of Metallothionein by Manganese Is Completely Dependent on Interleukin-6 Production /Kazuo Kobayashi, Junji Kuroda, Nobuo Shibata[et al.] // *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* -2007- Vol. 320, No. 2 - P. 721–727.
426. Klein D. Quantitation of Cu-containing metallothionein by a Cd-saturation method. / D. Klein, R. Bartsch, K. H. Summer // *Anal Biochem.*– 1990. – Vol. 189(1) – P. 35-39.
427. Shaikh Z.A. Comparison of cadmium-saturation assay and radioimmunoassay for the determination of metallothionein concentration in tissues. / Z. A. Shaikh, C. V. Nolan // *Experientia Suppl.* – 1987. – Vol. 52 – P.343-349.
428. Thomas D.G. Fluorometric ELISA for the detection and quantitation of metallothionein. / D. G. Thomas, H. J. Linton, J. S. Garvey // *J. Immunol. Methods.* – 1986.– Vol. 89(2) – P. 239-247.
429. Nolan C. V. Determination of metallothionein in tissues by radioimmunoassay and by cadmium saturation method. / C. V. Nolan, Z. A. Shaikh // *Anal Biochem.* – 1986– Vol. 154(1) – P. 213-223.
430. Recent developments in quantification methods for metallothionein. / M. Dabrio, A.R. Rodriguez, G.Bordin [et al.] // *J. Inorg. Biochem.* – 2002.– Vol. 15; №88(2) - P.123-134.
431. A gel filtration high-performance liquid chromatographic method for determination of hepatic and renal metallothionein of rat and in

- comparison with the cadmium -saturation method. / N. Jin, M. Kimura, K. Yokoi [et al.] // *Biol. Trace Elem Res.* – 1993.– Vol.36(2) – P. 183-190.
432. El Hourch M. An optimization procedure for determination of metallothionein by square wave cathodic stripping voltammetry – P. application to marine worms / M. El Hourch, A. Dudoit, J. C. Amiard / *Anal. Bioanal. Chem.* – 2004.– Vol. 378(3) – P. 776-781.
433. Rapid determination of metallothioneins in foods by capillary zone electrophoresis. / S. J. Hao, X. Li, J. X. Kang [et al.] // *Se Pu.* – 2002.– Vol.20(2) – P.163-166.
434. Aoki Y. A western blotting procedure for detection of metallothionein. / Y. Aoki, C. Tohyama, K. T. Suzuki // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 1991.– Vol.23(3) – P.207-216.
435. Detection of metallothionein isoforms from three different species using on-line capillary electrophoresis-mass spectrometry. / Knudsen C. B., Bjornsdottir I., Jons O. [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1998. – Vol.265(1) – P. 167-175.
436. A sensitive time-resolved fluorescent immunoassay for metallothionein protein. / H. Butcher, W. Kennette, O. Collins [et al.] // *J. Immunol. Methods.* – 2003.– Vol.15; № 272(1-2) – P.247-56.
437. Characterization of denatured metallothioneins by reversed phase coupled with on-line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection. / E. Bramanti, C. Lomonte, A. Galli [et al.] // *Chromatogr A.* – 2004. – Vol. 1054(1-2) – P. 285-291.
438. Wang Z. Use of surface-modified capillaries in the separation and characterization of metallothionein isoforms by capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry. / Z. Wang, A. Prange // *Anal. Chem.* - 2002 – Vol. 74(3) – P. 626-31.
439. Akintola D.F. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for human metallothionein-1 in plasma and urine. //D. F. Akintola, B. Sampson, A. Fleck // *J. Lab. Clin. Med.* -1995. – Vol. 126(2) – P. 119-27
440. Milnerowicz H. Determination of metallothionein in biological fluids using enzyme-linked immunoassay with commercial antibody. / H. Milnerowicz, A. Bizoc // *Acta Biochim. Pol.* – 2010. – Vol. 57, №1 – P. 99-104.
441. Kimura M. Detection of carboxymethylmetallothionein by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. / M. Kimura, S. Koizumi, F. Otsuka // *Methods Enzymol.* – 1991. – Vol.205 – P.114-119.

442. Gel permeation, ion-exchange and reversed-phase columns for separation of metallothioneins by high-performance liquid chromatography-atomic absorption spectrophotometry. / K. T. Suzuki, H. Sunaga, Y. Aoki [et al.] // J. Chromatogr. – 1983. – Vol. 23, № 281 – P.159-166.
443. Garvey J.S. Metallothionein – P. structure/antigenicity and detection/quantitation in normal physiological fluids. / J. S. Garvey // Environ. Health Perspect. – 1984.– Vol. 54 – P.117-127
444. Quantification of metallothionein isoforms in fish liver and its implications for biomonitoring. / M. Lacorn, A. Lahrsen, N. Rotzoll [et al.] // Environ. Toxicol. Chem. – 2001.– Vol. 20(1) – P. 140-145
445. Investigation of metal complexes with metallothionein in rat tissues by hyphenated techniques. / K. Poiec, M. Períz-Calvo, O. Garcáa-Arribas [et al.] // J. Inorg. Biochem. – 2002. – Vol. 88(2) – P. 197-206.
446. Ballatori N. Transport of toxic metals by molecular mimicry / N. Ballatori // Environ. Health Perspect. - 2002. – Vol. 110, Suppl. 5. – P. 689-694.
447. Bridges C. C. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals / C. C. Bridges, R. K. Zalups// Toxicol. Appl. Pharmacol. - 2005. – Vol. 204, No. 3. – P. 274-308.
448. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов I-IV групп: Справ. Изд. / Под ред. В.А. Филова. // Л.: Химия, 1988. – 512 с.
449. ATSDR, 1999. Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA.
450. Cadmium – Environmental Aspects. International Program on Chemical Safety. – Geneva, Switzerland: WHO. Environmental Health Criteria. - 1992. – Vol. 135. – 156 p.
451. Штабський Б. М., Гжегоцький М.Р. Ксенобіотики, гомеостаз і хімічна безпека людини. / Б. М. Штабський, М. Р. Гжегоцький. - Львів: Видавничий дім «НАУТІЛУС», 1999. – 308 с.
452. Liu J/ Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis / J. Liu, W. Qu, M. B. Kadiiska // Toxicol. Appl. Pharmacol. - 2009. – Vol. 238, No. 3. – P. 209-214.
453. Zalups R. K. Molecular handling of cadmium in transporting epithelia / R.K. Zalups, S. Ahmad. // Toxicol. Appl. Pharmacol., 2003. – Vol. 186. – Iss. 2. – P. 163–188.
454. Bertin G. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review).

ЛИТЕРАТУРА

- / G. Bertin, D. Averbeck // *Biochimie* - 2006. – Vol. 88, N 11. – P. 1549-1559.
455. Filipic M. Molecular mechanisms of cadmium induced mutagenicity. / M. Filipic, T. Fatur, M. Vudrag // *Hum. Exp. Toxicol.* - 2006. – Vol. 25, N 2. – P. 67-77.
456. Effect of dietary cadmium on tissue distribution of 109cadmium following a single oral dose in young goats / W. J. Miller, D. M. Blackmon, R. P. Gentry [et al.] // *J. Dairy Sci.* - 1969. - № 52. – P. 2029–2035.
457. Elsenhans B., Strugala G.J., Schдfer S.G. Small-intestinal absorption of cadmium and the significance of mucosal metallothionein // *Hum. Exp. Toxicol.*, 1997. – Vol. 16. – No. 8. – P. 429-434.
458. The relationship between gene expression of cationic and neutral amino acid transporters in the small intestine of chick embryos and chick breed, development, sex, and egg amino acid concentration / Zeng P.L., Li X.G., Wang X.Q. *Poult Sci.* - 2011 - № 90(11) – P. 2548-2556.
459. The Intestinal Peptide Transporter PEPT1 Is Involved in Food Intake Regulation in Mice Fed a High-Protein Diet / Ndssl A.M., Rubio-Aliaga I., Sailer M. *PLoS One.* – 2011 - № 6(10) - e26407. Epub 2011 Oct 21.
460. Garrick M. D. Human iron transporters / M. D. Garrick // *Genes Nutr.* - 2011. – Vol. 6, No.1. – P. 45–54.
461. A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocyte apical membrane /Cragg R.A., Christie G.R., Phillips S.R. [et al.] // *J Biol Chem.* - 2002 - № 277(25) – P. 22789-22797.
462. Souza V. Cadmium uptake by a human hepatic cell line. / V. Souza, L. Bucio, M. C. Gutierrez-Ruiz // *Toxicology.* – 1997.– Vol.120 – P.215–220
463. Toraason M. Interaction between calcium and cadmium in the 1,25-dihydroxy vitamin D3–stimulated rat duodenum. / M. Toraason, E. C. Foulkes // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1984. – Vol.75 – P.98-104.
464. Souza V. Cadmium uptake by a human hepatic cell line. / V. Souza, L. Bucio, M. C. Gutierrez-Ruiz // *Toxicology* – 1997.– Vol.120 – P.215-220
465. Blazka M. E. Differences in cadmium and mercury uptakes by hepatocytes – P. Role of calcium channels. / M. E. Blazka, Z. A.

- Shaikh // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 110 – P. 355–363.
466. Blazka M. E. Cadmium and mercury accumulation in rat hepatocytes. / M. E. Blazka, Z. A. Shaikh // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 113 – P. 118–125.
467. Foulkes E. C. Effects of Zn status, bile, and other endogenous factors on jejunal Cd absorption. / E. C. Foulkes, C. Voner // *Toxicology* – 1981.– Vol.22 – P.115-122.
468. Hoadley J. E. Effects of dietary zinc depletion and food restriction on intestinal transport in the rat. / J. E. Hoadley, R. Cousins // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1985. – Vol.180 – P.296-302.
469. Hoadley J.E. Kinetic analysis of zinc uptake and serosal transfer by vascularly perfused rat intestine / J.E. Hoadley, A. S. Leinart, R. J. Cousins // *Am. J. Physiol.* -1987. – Vol. 252, Iss. 6. – Pt. 1. – P. G825-831.
470. Corrigan A.J. Cellular uptake of cadmium and zinc. / A. J. Corrigan, P. C. Huang // *Biol. Trace. Elem. Res.* – 1981. – Vol.3 – P.197-216.
471. Shaikh Z. A. Metal transport in cells – P. Cadmium uptake by rat hepatocytes and renal cortical epithelial cells. / Z. A. Shaikh, M. E. Blazka, T. Endo // *Environ. Health. Perspect.* – 1995.– Vol. 103(Suppl 1) – P. 73-75.
472. Hinkle P. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. / Hinkle P., Kinsella P.M., Osterhoudt K.C. // *J. Biol. Chem.* – 1987.– Vol. 262 – P. 16333-16337.
473. Borowitz J. L. Evidence for calcium channels in brine shrimp – P. Diltiazem protects shrimp against cadmium. / J. L. Borowitz, J. L. McLaughlin // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* – 1992.– Vol. 48 – P. 435-440.
474. Foulkes E. C. Endogenous metallothionein as determinant of intestinal cadmium absorption – P. A reevaluation. / E. C. Foulkes, D. M. McMullen // *Toxicology* – 1986. – Vol. 38 – P. 285–291.
475. Foulkes E. C. Apparent competition between myoglobin and metallothionein for renal reabsorption. Foulkes E.C. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* - 1978– Vol. 159 – P. 321–323.
476. Foulkes E. C. Renal tubular transport of cadmium metallothionein. / E. C. Foulkes // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1978. – Vol. 45 – P. 505-512.
477. Souza V. Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68 cells) / V. Souza, L. Bucio, M.C. Gutierrez_Ruiz // *J. Toxicology* – 1997. – Vol. 120, N 320 – P 215-218.

ЛИТЕРАТУРА

478. The effects of ovariectomy and female sex hormones on hepatic metallothionein-I gene expression after injection of cadmium chloride in mice.. Sogawa N, Sogawa CA, Oda N, [et al.] // Pharmacol. Res. – 2001. – Vol. 44(1) – P. 53-57.
479. Analysis of the effects of overexpression of metallothionein-I in transgenic mice on the reproductive toxicology of cadmium / T.Dalton, K. Fu, G.C. Enders [et al.] // Environmental Health Perspectives – 1996. – Vol. 104, № 1 – P. 68-76.
480. Protective effects of selenium on cadmium toxicity in rats: role of altered toxicokinetics and metallothionein. / Z. Z. Wahba, T. P. Coogan, S. W. Rhodes [et al.] // Journal of Toxicology and Environmental Health – 1993. – Vol. 38, № 2 – P. 171-182.
481. Cadmium accumulation and metallothionein concentrations after 4-week dietary exposure to cadmium chloride or cadmium-metallothionein in rats// J. P Groten, E. J. Sinkeldam, J. B. Luten [et al.] // Toxicology and Applied Pharmacology – 1991. –Vol. 111, № 3 – P. 504-513.
482. Curtis D. Klaassen. Induction of Metallothionein as an Adaptive Mechanism Affecting the Magnitude and Progression of Toxicological Injury / Curtis D. Klaassen and Jie Liu// Environmental Health Perspectives - 1998 - № 106, Suppl 1 – P. 297–300.
483. Dorian C. Discrepancy between the nephrotoxic potencies of cadmium-metallothionein and cadmium chloride and the renal concentration of cadmium in the proximal convoluted tubules. // C. Dorian, V.H. Gattone, C.D. Klaassen // Toxicology and Applied Pharmacology – 1995. – VOL. 130, № 1 – P 161-168.
484. Groten J. P. Dietary iron lowers the intestinal uptake of cadmium-metallothionein in rats// J. P. Groten, J. B. Luten, P. J. van Bladeren // European Journal of Pharmacology – 1992. – Vol. 228, № 1 – P. 23-28.
485. Protective effect of metallothionein on intracellular pH changes induced by cadmium / T.Koizumi, T. Yokota, S. Ohmori [et al.] // Toxicology. – 1995.– Vol. 95, № 1-3 – P. 11-17.
486. Chan H.M. Protective roles of metallothionein and glutathione in hepatotoxicity of cadmium / H. M. Chan, M. G. Cherian // Toxicology. – 1992.– Vol. 72, № 3 – P. 281-90.
487. Himeno S. Application of metallothionein null cells to investigation of cadmium transport / S. Himeno // J Inorg Biochem – 2002. – Vol. 15; № 88(2) – P.207-212.
488. Possible mechanism for zinc protection against cadmium cytotoxicity in cultured vascular endothelial cells. / T. Kaji, A.

- Mishima, E. [et al.] // J. Toxicology – 1992. –Vol. 76, № 3- P. 257-70.
489. Changes in endogenous Zn and Cu distribution in different cytosolic protein fractions in mouse liver after administration of a single sublethal dose of CdCl₂ / M. S. Yang, K. P. Lai, K. Y. Cheng [et al.] // Toxicology. – 2000.– Vol. 154, № 1-3 – P. 103-111.
490. Klaassen C.D. Metallothionein protection of cadmium toxicity / C. D. Klaassen, J. Liu, B. A. Diwan // Toxicol. Appl. Pharmacol. - 2009. – Vol. 238, No. 3. – P. 215-220.
491. Lau J.C. Role of placental metallothionein in maternal to fetal transfer of cadmium in genetically altered mice / J. C. Lau, M. G. Joseph, M.G. Cherian// Toxicology – 1998. – Vol. 127, № 1-3 – P. 167-78.
492. Torreblanca A. Cadmium effect on zinc metabolism in human trophoblast cells P. involvement of cadmium-induced metallothionein / A. Torreblanca, Del_Ramo J., Sarkar B.// Toxicology– 1992. - Vol. 72, № 2- P. 167-174.
493. Bertin G. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review) / G. Bertin, D. Averbeck // Biochimie - 2006. – Vol. 88, No. 11. – P. 1549-1559.
494. Satoh M. Low dose exposure to cadmium and its health effects. (3) Toxicity in laboratory animals and cultured cells / M. Satoh, T. Kaji, C. Tohyama // Nippon Eiseigaku Zasshi. – 2003 - Vol. 57(4) – P. 615-623.
495. Tolerance to cadmium cytotoxicity is induced by zinc through non-metallothionein mechanisms as well as metallothionein induction in cultured cells / Mishima A., Yamamoto C., Fujiwara Y. [et al.] // J. Toxicology - 1997. – Vol.118, No. 2-3. – P. 85-92.
496. Effects of one-year cadmium exposure on livers and kidneys and their relation to glutathione levels. / T. Kamiyama, H. Miyakawa, J.P. Li [et al.] // Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology – 1995.– Vol. 88, № 2 – P. 177-186.
497. Nomiya K. Modified Trace Element Metabolism in Cadmium-Induced Renal Dysfunctions// K. Nomiya, H. Nomiya //Acta Pharmacologica et Toxicologica – 1986.– Vol. 59, Supplement 7 – P. 427-430.
498. Трахтенберг И.М. Ртуть и ее соединения в окружающей среде. / И.М.Трахтенберг, М.Н. Коршун, Киев, 1990.
499. Ершов Ю.А. Механизмы токсического действия неорганических

ЛИТЕРАТУРА

- ких соединений. / Ю. А. Ершов, Т. В. Плетенева - М., 1989.
500. Глинка Н. Л. Общая химия. / Н. Л. Глинка - Л., 1989.
501. Некрасов Б. В. Курс общей химии. / Б.В. Некрасов - М., 1962.
502. Трахтенберг И. М. Современные представления о воздействии ртути на клеточные мембраны / Трахтенберг И.М., Иванова Л.А. // Гигиена и санитария – 1989 - N 5. – С. 22-27.
503. Метилртуть. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Вып 101 – Р. Пер. с англ. -Женева – Р. ВОЗ, 1993. – 125 С.
504. Неорганическая ртуть. Гигиенические критерии состояния окружающей среды. Вып 118.. – Р. Пер. с англ. – Женева – Р. ВОЗ, 1994.-144 С.
505. International Programme on Chemical Safety//Environmental Health Criteria 1. Mercury-1976.
506. Langford N. Toxicity of mercury / N. Langford, R. Ferner // J. Hum. Hypertens. - 1999.-Vol. 13, No. 10. – P. 651-656
507. Guidance for Identifying Populations at Risk Due to Exposures to Mercury. – Geneva: UNEP. Chemicals, 2005. – 132 p.
508. Angels Leiva-Presa. Mercury(II) binding to metallothioneins Variables governing the formation and structural features of the mammalian Hg-MT species. / Angels Leiva-Presa, Mercu Capdevila, Pilar Gonzalez-Duarte // European Journal of Biochemistry. - 2004- Vol. 271, Issue 23-24 – P. 4872–4880.
509. Zalups R. K. Molecular interactions with mercury in the kidney. / R. K. Zalups // Pharmacol Rev. - 2000 - №52(1) – P.113-143.
510. Leiva-Presa A. Mercury (II) binding to metallothioneins / A. Leiva-Presa, M. Capdeliva, Gonzalez-Duarte P. // Eur. J. Biochem., 2004. – Vol. 271. – P. 4872-4880.
511. Zalups R. K.. Molecular Interaction with Mercury in the Kidney / R.K. Zalups. // Parm. Rev. - 2008. – Vol. 52. – No. 1. – P. 113-143
512. Zalups R. K. Mercury-metallothionein and the renal accumulation and handling of mercury / R. K. Zalups, M. G. Cherian, D.W. Barfuss // Toxicology – 1993.– Vol. 83, № 1-3 – P. 61-78.
513. Maternal-to-fetus transfer of mercury in metallothionein-null pregnant mice after exposure to mercury vapor / Yoshida M., Satoh M., Shimada A. [et al.] // Toxicology – 2002.– Vol. 175(1-3) – P. 215-222.
514. Pulmonary toxicity caused by acute exposure to mercury vapor is enhanced in metallothionein-null mice. / Yoshida M., Satoh M.,

- Shimada A. [et al.] // *Life Sci.* – 1999. – Vol. 64(20) – P. 1861-1867.
515. Renal metallothionein responds rapidly and site specifically to zinc repletion in growing rats / Szczurek E.I., Bjornsson C.S., Noto A.D. [et al.] // *J. Trace Elem. Med. Biol.* - 2009. – Vol. 23, No. 3. – P. 176-182.
516. Гоженко А. И. Функциональное состояние почек в условиях водной солевой нагрузки при беременности у крыс на фоне сулемовой нефропатии / А. И. Гоженко, А. Н. Слученко // *Нефрология : научно-практический журнал / Санкт-Петербургский медицинский университет им. И.П. Павлова, Северо-Западная ассоциация нефрологов и врачей диализа, АОЗТ “Меделен”.* — 2006. — Том 10, N 1. — С. 72-76.
517. Шафран Л.М.. Металонефропатії: теорія і практика / Л. М. Шафран, А. І. Гоженко // *Ж. Актуальные проблемы транспортной медицины* - 2009. - № 1 (15). - С. 19-29.
518. Шафран Л.М. Профессионально обусловленные металлонефропатии на транспорте: этиопатогенез, диагностика, профилактика / Л. М. Шафран, А. И. Гоженко // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН* - 2009. - № 1 (65). – С. 141-146;
519. Шафран Л.М. Содержание тяжелых металлов в биосубстратах больных различного профиля как маркер токсичных нефропатий / Шафран Л.М., Большой Д.В., Пыхтеева Е.Г. // *Ж. Актуальные проблемы транспортной медицины* - 2009. - № 1 (15). - С. 29-36.
520. Стужук О. С. Моніторинг вмісту металів у крові дітей з нефропатією. /О.С.Стужук, Н.Н.Фролова, О.Г.Пихтеева, Д.В.Большой. // *Медична хімія.* -2009 - № 3, том 11 - С. 152.
521. Attenuation of nuclear factor kappa B (NF-kappaB) promotes apoptosis of kidney epithelial cells – P. a potential mechanism of mercury-induced nephrotoxicity. / J. S. Woods, F. J. Dieguez-Acuna, M. E. Ellis [et al.] // *Environ. Health Perspect.* – 2002. – V. 110, Suppl. 5 – P.819-822.
522. Foulkes E. C. // *Transport of Heavy Metals by the Kidney* / E. C. Foulkes // *Toxicology Letters.*– 1990. – V. 53, № 1-2 – P. 29-31.
523. Nordberg G.F. Subcellular Targets of Cadmium Nephrotoxicity: Cadmium Binding to Renal Membrane Proteins in Animals With or Without Protective Metallothionein Synthesis / G. F. Nordberg, T. Jin, M. Nordberg // *Environ. Health Perspectives* - 1994. – Vol. 102, Suppl. 3. – P. 191-194.
524. Thйvenod F. Catch me if you can! Novel aspects of cadmium transport in mammalian cells / Thйvenod F. // *Biometals* - 2010. –

- Vol. 23, Iss. 5. – P. 857-875.
525. Hammond T. G. Cubilin is metallothionein /heavy metal renal receptor / T. G. Hammond // Crisp Data Base National Institutes of Health.
526. Role of ARF6 in internalization of metal-binding proteins, metallothionein and transferrin, and cadmium-metallothionein toxicity in kidney proximal tubule cells / Wolff N. A., Lee W. K., Abouhamed M. [et al.] // Toxicol Appl Pharmacol. - 2008. – Vol. 230. – No. 1. – P. 78-85.
527. Wolff N. A. Role of Arf1 in endosomal trafficking of protein-metal complexes and cadmium-metallothionein-1 toxicity in kidney proximal tubule cells / N. A. Wolff, W. K. Lee, F. Thйvenod // Toxicol. Lett. - 2011. – Vol. 203, Iss. 3. – P. 210-218.
528. Determinants of Rab5 Interaction with the N Terminus of Early Endosome Antigen 1 / E. Merithew, C. Stone, S. Eathiraj [et al.] / J. Biol. Chem. - 2003. - Vol. 278, No. 10. – P. 8494–8500.
529. Liu J. Nephrotoxicity of CdCl₂ and Cd-Metallothionein in Cultured Rat Kidney Proximal Tubules and LLC-PK1 Cells / J. Liu, Y. Liu, C. D. Klaassen // Toxicology and Applied Pharmacology - 1994. – Vol. 128, Iss. 2 – P. 264-270.
530. Sens D.A. Metallothionein isoforms and human nephrotoxicity / Sens D.A.// Crisp Data Base National Institutes Of Health
531. Cadmium nephrotoxicity and evacuation from the body in a rat modeled subchronic intoxication. / T. Aoyagi, K. Hayakawa, K. Miyaji [et al.] // International Journal of Urology – P. Official Journal of the Japanese Urological Association – 2003. – V. 10, № 6 – P. 332-338
532. Shaikh Z. A. Metallothionein in the Extracellular Fluids as an Index of Cadmium Toxicity /Z. A. Shaikh, K. Hirayama // Environmental Health Perspectives – 1979.– V. 28 – P. 267-271.
533. Nordberg M. Cadmium, metallothionein and renal tubular toxicity / M. Nordberg, T. Jin, G. F. Nordberg// – 1992. - J. IARC Sci. Publ. – № 118 – P. 293-297.
534. Cadmium nephrotoxicity and evacuation from the body in a rat modeled subchronic intoxication / T. Aoyagi, K. Hayakawa, K. Miyaji [et al.] // Int. J. Urol. – 2003.– V. 10(6) – P. 332-338.
535. Non-metallothionein-bound cadmium in the pathogenesis of cadmium nephrotoxicity in the rat. / R. A. Goyer, C. R. Miller, S. Y. Zhu [et al.] // J. Toxicology and Applied. Pharmacology – 1989.– V. 101, № 2 – P. 232-244

536. Zalups R. K. Evidence for basolateral uptake of cadmium in the kidneys of rats. / R. K. Zalups // *Toxicol Appl Pharmacol.* - 2000 - № 164(1) – P. 15-23.
537. Гоженко А. И. Патогенез токсических нефропатий / А. И. Гоженко. // Ж. Актуальные проблемы транспортной медицины -2006. - № 2(4). - С 9-13
538. Cadmium, zinc, and copper in rabbit kidney metallothionein—relation to kidney toxicity / C. G. Elinder, M. Nordberg, B. Palm [et al.] // *J. Environmental Research* – 1987. – V. 42, № 2 – P. 553-562
539. Effects of inorganic divalent cations on the renal basolateral transport system for organic anions. / H. Hohage, F. Matzkies, U. Mergelsberg [et al.] // *J Appl Toxicol.* – 1999. - №19(5) – P. 337-340.
540. Гоженко А.И. Особенности количественных характеристик структурных изменений почек крыс после сулемовой затравки на фоне гипо- или гипернатриевой диеты / Гоженко А.И. Шпак В.С., Насибуллин Б.А. // *Патология.* – 2007. – Т. 4, №2. – С. 72-76
541. Dose-dependent mercuric chloride tubular injury in rat kidney / A. Stacchiotti, E. Borsani, L. Rodella [et al.] // *Ultrastruct. Pathol.* – 2003.– № 27(4) – P.253-259.
542. Dorian C. Renal cadmium deposition and injury as a result of accumulation of cadmium-metallothionein (CdMT) by the proximal convoluted tubules – A light microscopic autoradiography study with ¹⁰⁹CdMT. / C. Dorian, V.H. Gattone, C.D. Klaasen // *Toxicology and Applied Pharmacology* – 1992.–V. 114, № 2 – P. 173-181.
543. Nordberg G. F. Subcellular targets of cadmium nephrotoxicity – P. cadmium binding to renal membrane proteins in animals with or without protective metallothionein synthesis / G. F. Nordberg, T. Jin, M. Nordberg // *Environmental Health Perspectives* – 1994.– V. 102, Suppl 3 – P. 191-194.
544. Leffler P. E. Differential calcium transport disturbances in renal membrane vesicles after cadmium-metallothionein injection in rats. / P. E. Leffler, T. Jin, G. F. Nordberg // *J. Toxicology* – 2000. – V. 143, № 3 – P. 227-234.
545. Influence of zinc and copper administration on metal disposition in rats with cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity / X. Liu, T. Jin, G. F. Nordberg [et al.] // *J Toxicology and Applied Pharmacology* – 1994. – V. 126, № 1 – P. 84-90
546. A multivariate study of protective effects of Zn and Cu against nephrotoxicity induced by cadmium metallothionein in rats. / X. Y.

ЛИТЕРАТУРА

- Liu, T. Y. Jin, G. F. Nordberg [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology* – 1992. - V. 114, № 2 – P. 239-245
547. . Hepatic and renal metallothionein induction by an oral equimolar dose of zinc, cadmium or mercury in mice / S. K. Tandon, S. Singh, S. Prasad [et al.] // *Food and Chemical Toxicology* – 2001. – V. 39, № 6 – P. 571-577
548. Murakami M. Cadmium-metallothionein-induced nephropathy – P. a morphological and autoradiographic study of cadmium distribution, the development of tubular damage and subsequent cell regeneration / M. Murakami, K. Cain, M. Webb // *Journal of Applied Toxicology* – 1983. – V. 3, № 5 – P. 237-244
549. Nomiya K. Plasma cadmium-metallothionein, a biological exposure index for cadmium-induced renal dysfunction, based on the mechanism of its action / K. Nomiya, H. Nomiya, N. Kameda // – *Toxicology*– 1998. - V. 129, № 2-3 – P. 157-68
550. The teratogenicity of cadmium-metallothionein in the rat / M. Webb, D. Holt, N. Brown, [et al.] // *Archives of Toxicology* – 1988. – V. 61, № 6 – P. 457-67.
551. Dorian C. Protection by zinc-metallothionein (ZnMT) against cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity / C. Dorian, C. D. Klaassen // *Fundamental and Applied Toxicology* - 1995. - V. 26, № 1 – P. 99-106.
552. Cd-metallothionein nephrotoxicity in inbred strains of mice / L. E. Sendelbach, W. C. Kershaw, F. Cuppage [et al.] // *Journal of Toxicology and Environmental Health* -1992. – V. 3, № 2 – P. 115-126
553. Exogenous metallothionein and renal toxicity of cadmium and mercury in rats. / H. M. Chan, M. Satoh, R. K. Zalups [et al.] // *Toxicology*.– 1992. – V. 22; №76(1) – P. 15-26.
554. Chronic combined exposure to cadmium and arsenic exacerbates nephrotoxicity, particularly in metallothionein-I/II null mice / J. Liu, Y. Liu, S. M. Habeebu [et al.] // *Toxicology* – 2000. – V. 147, № 3- P. 157-166
555. Metallothionein-I/II null mice are sensitive to chronic oral cadmium-induced nephrotoxicity. / Y. Liu, J. Liu, S. M. Habeebu [et al.] // *Toxicol. Sci.* – 2000. – №. 57 – P. 167–176
556. Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein -I/II-null mice. / J. Liu, M. B. Kadiiska, J. C. Corton [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 32(6) – P.525-535.

557. Inhibition of Na(+)-glucose cotransport in kidney cortical cells by cadmium and copper – P. protection by zinc / S. Blumenthal, D. Lewand, A. Sochanik [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology* – 1994. – V. 129, № 2 – P. 177-187
558. Metallothionein isoform 3 and proximal tubule vectorial active transport. / D. Kim, S. H. Garrett, M. A. Sens [et al.] // *Kidney Int* - 2002 - № 61(2) – P. 464-472.
559. Hammond T.G. Cubilin is metallothionein /heavy metal renal receptor / T.G. Hammond // *Crisp Data Base National Institutes of Health*.
560. Zalups R.K. Renal metallothionein metabolism after a reduction of renal mass. I. Effect of unilateral nephrectomy and compensatory renal growth on basal and metal-induced renal metallothionein metabolism. / R. K. Zalups, M. G. Cherian// *J Toxicology* - 1992. - V 71, N 1-2. - P. 83-102.
561. Zalups R. K. Renal metallothionein metabolism after a reduction of renal mass. I. Effect of unilateral nephrectomy and compensatory renal growth on basal and metal-induced renal metallothionein metabolism. / R.K.Zalups, M.G. Cherian// *Toxicology* – 1992. – V. 71, № 1-2.- P. 83-102.
562. Nordberg G. F. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China / G. F. Nordberg // *Toxicol Lett.* – 2010. - № 192(1) – P. 45-49.
563. Prevalence of kidney dysfunction in humans - relationship to cadmium dose, metallothionein, immunological and metabolic factors. / G. F.Nordberg, T. Jin, X. Wu [et al.] // *Biochimie.* – 2009- № 91(10) – P. 1282-1285.
564. Preclinical evaluation of novel urinary biomarkers of cadmium nephrotoxicity. / W. C. Prozialeck, J. R. Edwards, V. S.Vaidya [et al.] // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2009. - № 238(3) – P. 301-305.
565. Prevalence of metallothioneinuria among the population living in the Kakehashi River basin in Japan—an epidemiological study. / Z. A. Shaikh, T. Kido, H. Kito [et al.] // *J Toxicology* – 1990 – V. 64, № 1 – P. 59-69
566. Dose-response relationship between urinary cadmium and metallothionein in a Japanese population environmentally exposed to cadmium / T. Kido, Z. A. Shaikh, H. Kito [et al.] // *Toxicology* – 1991. –V. 65, № 3 – P. 325-32
567. Роговий Ю.Є. Механізми розвитку тубуло-інтерстиційних пошкоджень при патології нирок (експериментальне досліджен-

ЛИТЕРАТУРА

- ня) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук: спец. 14.03.04 "Патологічна фізіологія" / Ю.Є. Роговий. – Одеса, 2000. – 36 с
568. Шафран Л. М. Связывание ионов ртути с белками *in vitro* / Шафран Л.М., Большой Д.В., Пыхтеева Е.Г.// Зб. наук. праць „Гігієна населених місць”,. – К., 2004. – Вип. 44. - С.203-207.
569. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats / Ana I. Morales, Cersar Vicente-Sarñchez, Mirjana Jerkic [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology* - 2006 - № 210 - P. 128 - 135.
570. *Comprehensive toxicology* / Ed.-in-Chief: I.G. Sipes, Ch.A. McQueen, A.J. Gandolfi. – Vol. 7. *Renal Toxicology* / Vol. ed. R.S. Goldstein. – Oxford: Pergamon Press, 1997. – 716 p.
571. *The Kidney* / Edit by Barry M. Brenner. – Philadelphia: W.B. Saunders Co., 2003. - 7th ed. – Vol. 1-2. – 3072 p.;
572. Gozhenko A. I. Functional renal reserve at the pathology / A. I. Gozhenko // 5th International Congress of Pathophysiology: Abstract. – China, 2006. – P. 158.
573. Нефрология: учебн. пособ. для послевуз. образования / Под ред. Е.М. Шилова. – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 696 с.
574. Шафран Л. М. «Эпителиальная болезнь» как морфофункциональная основа нефротоксичности ртути // Л. М.Шафран, Д. В. Большой // Бюллетень IV читань ім. В.В. Підвисоцького. 26-27 травня 2005 р. Матеріали наукової конференції. – Одеса, 2005. - С.16-19
575. Эпителиальные клетки как мишень воздействия малых доз кадмия и ртути / Шафран Л.М., Большой Д.В., Потапов Е.А. [и др.] // *Ж. Актуальные проблемы транспортной медицины*, 2007. - № 2 (8). - С. 124-129.
576. Mechanism of protection by metallothionein against acetaminophen hepatotoxicity. / Chieko Saito, Hui-Min Yan, Antonio Artigues [et al.] // *Toxicol Appl Pharmacol.* - 2010 - Vol. 242(2) – P. 182–190.
577. Park J.D. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals/ J. D. Park, Y. Liu, C. D. Klaassen // *Toxicology* – 2001. – Vol. 163, № 2-3 – P. 93-100.
578. Tapiero H. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. H. Tapiero, K. D. Tew // *Biomed Pharmacother.* - 2003 - № 57(9) – P. 399-411.

579. Zinc Supplementation Enhances Hepatic Regeneration by Preserving Hepatocyte Nuclear Factor-4 β in Mice Subjected to Long-Term Ethanol Administration. / Xinqin Kang, Zhenyuan Song, Craig J. McClain [et al.] // *Am J Pathol.* - 2008 - № 172(4) – P. 916–925.
580. Gagnon Z. E., Induction of metallothionein in chick embryos as a mechanism of tolerance to platinum group metal exposure.// Z. E. Gagnon, A. Patel, *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* - 2007 - № 42(3) – P. 381-387.
581. Effects of subchronic digestive exposure to organic or inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. / F. Hispard, A. de Vaulfleur, H. Martin [et al.] // *Ecotoxicol Environ Saf.* - 2008 - № 70(3) – P. 490-498.
582. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. / Borges L. P., R. Brandro, B. Godoi [et al.] // *Chem Biol Interact.* - 2008 - № 171(1) – P. 15-25.
583. McKim J. M. Distribution of cadmium chloride and cadmium-metallothionein to liver parenchymal, Kupffer, and endothelial cells – P. their relative ability to express metallothionein. / J. M. McKim, J. Liu, Y. P. Liu [et al.] // *Toxicology and Applied Pharmacology* – 1992.– V. 112, № 2- P. 324-30
584. Gastrointestinal uptake of trace elements are changed during the course of a common human viral (Coxsackievirus B3) infection in mice. / N. G. Илбдск, P. Frisk, J. Tallkvist [et al.] // *J Trace Elem Med Biol.* – 2008. - № 22(2) – P. 120-130.
585. Frisk P. Tissue uptake of mercury is changed during the course of a common viral infection in mice. // P. Frisk, Y. Molin , N. G.Илбдск // *Environ Res.* - 2008 - № 106(2) – P. 178-184.
586. .Metallothionein is induced and trace element balance changed in target organs of a common viral infection. / N. G. Илбдск, A. W. Glynn, L. Wikberg [et al.] // *Toxicology.* - 2004 № 199(2-3) – P. 241-250.
587. Interferon-alpha-induced changes in metallothionein expression in liver biopsies from patients with chronic hepatitis C. / T. Nagamine, K. Suzuki, T. Kondo [et al.] // *Can J Gastroenterol.* - 2005 - № 19(8) – P. 481-486.
588. Bracken W. M. Induction of Metallothionein by Steroids in Rat Primary Hepatocyte Cultures Induction / W. M. Bracken, C. D. Klaassen // *Toxicology and Applied Pharmacology* - 1987.- Vol. 87, No. 3 – P. 381-388.
589. Interactions between metallothionein inducers in rat liver and

- primary cultures of rathepatocytes. / J. Hernandez, M. Giralt, E. Beloso [et al.] // *J. Chem Biol Interact.* - 1996 – № 100(1) – P. 27-40.
590. Investigations on the estrogenic activity of the metallohormone cadmium in the rat intestine. N. Hüfer, P. Diel, J. Wittsiepe [et al.] // *Arch Toxicol.* - 2010 - № 84(7) – P. 541-552.
591. Temporal responses to intrinsically coupled calcium and zinc dyshomeostasis in cardiac myocytes and mitochondria during aldosteronism. / G. Kamalov, R. A. Ahokas, W. Zhao [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* - 2010 - № 298(2) – P. H385-H394.
592. Oliver J. R. Impaired hepatic regeneration in metallothionein-I/II knockout mice after partial hepatectomy. / J. R. Oliver, T. W. Mara, M. G. Cherian // *Exp Biol Med (Maywood).* - 2005 - № 230(1) – P. 61-67.
593. Cherian M.G. Metallothionein and liver cell regeneration. / M. G. Cherian, Y. J. Kang // *Exp Biol Med (Maywood)* - 2006 -№ 231(2) – P. 138-144.
594. Kang Y. J. Zinc prevention and treatment of alcoholic liver disease. / Y. J. Kang, Z. Zhou // *Mol Aspects Med.* - 2005 - № 26(4-5) – P. 391-404.
595. Metallothionein-independent zinc protection from alcoholic liver injury. / Z. Zhou, X. Sun, J. C.Lambert [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2002.– Vol. 160(6) – P. 2267-2274.
596. Distribution of zinc-binding metallothionein in cirrhotic liver of rats administered zinc / S. Sato, M. Shimizu, T. Hosokawa [et al.] // *Pharmacology and Toxicology* – 2000. –Vol. 87, № 6- P. 292-296.
597. Cadmium, Zinc, Copper and Metallothionein Levels in Human Liver / E. M. Bem, J. K. Piotrowski, M. Sobczak-Kozłowska [et al.] // *International Archives of Occupational and Environmental Health* - 1988. - Vol. 60, No. 6. – P. 413-417.
598. [Study on blood and buccal mucous related genes expression in the patients suffering from coal-burning arsenism]. Yang Q, Han B, Wu J, [et al.] // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* - 2009 - № 89(21) – P. 1446-1449.
599. Smolarek C. [Therapy of Wilson disease] /Smolarek C, Stremmel W. // *Z Gastroenterol.* - 1999 - № 37(4) – P. 293-300.
600. Cellular mechanisms underlying the protective effects of preoperative feeding: a randomized study investigating muscle and liver glycogen content, mitochondrial function, gene and protein expression. / S. Awad, D. Constantin-Teodosiu, D. Constantin [et

- al.] // *Ann Surg.* – 2010 - № 252(2) – P. 247-253.
601. Крыжановский Г.Н. *Общая патофизиология нервной системы. Руководство.* / Г. Н. Крыжановский - М.: Медицина, 1997. – 352 С.
602. A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology / N. Thirumoorthy, A. S. Sunder, K. T. M.Kumar [et al.] // *World Journal of Surgical Oncology* - 2011. – Vol. 9, No. 1. – P. 54-61.
603. Mercury-Induced Cognitive Impairment in Metallothionein-1/2 Null Mice / D. Eddins, A. Petro, N. Pollard [et al.] // *Neurotoxicol. Teratol.* - 2008. – Vol. 30, No. 2. – P. 88–95.
604. Metallothionein-IIA promotes neurite growth via the megalin receptor. / M. Fitzgerald, P. Nairn, C. A. Bartlett [et al.] // *Exp Brain Res* - 2007 -№ 183 – P. 171–180.
605. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system / J. Hidalgo, M. Aschner, P. Zatta [et al.] // *Brain Res. Bull.* - 2001. - № 55(2) – P. 133-145.
606. Kameo S. Metal components analysis of metallothionein-III in the brain sections of metallothionein-I and metallothionein-II null mice exposed to mercury vapor with HPLC/ICP-MS / S. Kameo, K. Nakai, N. Kurokawa // *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005. – Vol. 381, Iss. 8. – P.1514-1519.
607. Hidalgo J. Metallothioneins and brain injury: What transgenic mice tell us / J. Hidalgo // *Environ. Health Prev. Med.* - 2004. - Vol. 9, No. 3. – P. 87-94.
608. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system / J. Hidalgo, M. Aschner, P. Zatta [et al.] // *Brain Res. Bull.* - 2001. - № 55(2)- P. 133-145.
609. Metal components analysis of metallothionein-III in the brain sections of metallothionein-I and metallothionein-II null mice exposed to mercury vapor with HPLC/ICP-MS / S. Kameo, K. Nakai, N. Kurokawa [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2005 - № 381(8) – P. 1514-1549.
610. Mercury accumulation and its distribution to metallothionein in mouse brain after sub-chronic pulse exposure to mercury vapor / A. Yasutake, M. Sawada, A. Shimada [et al.] // *Arch. Toxicol.* - 2004. – Vol. 78, No. 9. – P. 489-495.
611. Redefining the Role of Metallothionein within the Injured Brain / Chung R. S., Penkowa M., Dittmann J. [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2008. – Vol. 283. – P. 15349–15358

ЛИТЕРАТУРА

612. Effect of neuroprotective drugs on gene expression in G93A/SOD1 mice // S. Ignacio, D. H. Moore, A. P. Smith [et al.] // Ann. N.Y. Acad. Sci. - 2005. – Vol. 1053. – P. 121-136.
613. Metallothionein-III prevents glutamate and nitric oxide neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons / Montoliu C., Monfort P., Carrasco J. [et al.] // J. Neurochem. - 2000. – Vol. 75, No. 1. – P. 266-273.
614. Aschner M. The functional significance of brain metallothioneins / Aschner M. // FASEB J. - 1996. – Vol.10, No. 10. – P. 1129-1136.
615. Dyrea JG. Research into mercury exposure and health education in subsistence fish-eating communities of the Amazon basin: potential effects on public health policy / J. G. Dyrea // Int J Environ Res Public Health. - 2010 - № 7(9) – P. 3467-3477.
616. Emergence of delayed methylmercury toxicity after perinatal exposure in metallothionein-null and wild-type C57BL mice. / M. Yoshida, N. Shimizu, M. Suzuki [et al.] // Environ Health Perspect. - 2008 - №116(6) – P. 746-751.
617. Stankovic R.K. Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology / R. K. Stankovic, R. S. Chung, M. Penkowa // Int J Biochem Cell Biol. – 2007. - № 39(3) – P. 484-489.
618. Berlet H. H. Divalent metals of myelin and their differential binding by myelin basic protein of bovine central nervous system / H. H. Berlet, H. Bischoff, F. Weinhardt // -1994 № 179(1-2) – P. 75-78.
619. Lockman P.R. Inhibition of the rat blood-brain barrier choline transporter by manganese chloride / P. R. Lockman, K. E. Roder, D. D. Allen // J Neurochem. - 2001 -№ 79(3) – P. 588-594.
620. Cadmium-Metallothionein Interactions in the Olfactory Pathways of Rats and Pikes / Jonas Tallkvist, Eva Persson, Jürgen Henriksson [et al.] // Toxicological Sciences - 2002.- V. 67 – P. 108-113
621. Cd(2+)-induced injury in CNS white matter. / R. Fern, J. A. Black, B. R. Ransom [et al.] // J Neurophysiol. - 1996 – № 76(5) – P. 3264-3273.
622. Nervous system effects of dissolved and nanoparticulate cadmium in rats in subacute exposure /Horváth E, Oszlónczy G, Mót Z. [et al.] // J Appl Toxicol. - 2011 Feb 23. doi: 10.1002/jat.1664. [Epub ahead of print]
623. Apostoli P. Metal ions affecting reproduction and development / P. Apostoli, S. Catalani // Met Ions Life Sci. – 2011 - № 8. – P. 263-303.

624. Cadmium chronotoxicity at pituitary level: effects on plasma ACTH, GH, and TSH daily pattern / Caride A, Fernández-Pérez B, Cabaleiro T. [et al.] // *J Physiol Biochem.* - 2010 - № 66(3) – P. 213-220.
625. Cadmium effects on 24h changes in glutamate, aspartate, glutamine, GABA and taurine content of rat striatum /B. Fernández-Pérez , A. Caride , T. Cabaleiro [et al.] // *J Trace Elem Med Biol.* - 2010 - № 24(3) – P. 212-218.
626. Penkowa M. Treatment with metallothionein prevents demyelination and axonal damage and increases oligodendrocyte precursors and tissue repair during experimental autoimmune encephalomyelitis / M. Penkowa, J. Hidalgo // *J Neurosci Res.* - 2003 - № 72(5) – P. 574-586.
627. Metallothionein-I+II in neuroprotection. / M. Pedersen, R. Jensen, D. S. Pedersen, [et al.] // *Biofactors.* - 2009 - № 35(4) - P. 315-325.
628. Aschner M. The functional significance of brain metallothioneins / Aschner M. // *FASEB J.* - 1996 - № 10(10) – P. 1129-1136.
629. A metallothionein mimetic peptide protects neurons against kainic acid-induced excitotoxicity / Sonn K, Pankratova S, Korshunova I. [et al.] // *J Neurosci Res.* - 2010 - № 88(5). – P. 1074-1082.
630. Metallothionein induces a regenerative reactive astrocyte phenotype via JAK/STAT and RhoA signalling pathways / Leung YK, Pankhurst M, Dunlop SA. [et al.] // *Exp Neurol.* - 2010. - № 221(1) – P. 98-106.
631. Redefining the Role of Metallothionein within the Injured Brain Extracellular Metallothioneins Play an Important Role in the Astrocyte-Neuron Response to Injury / R.S. Chung, M. Penkowa, J. Dittmann [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2008. - Vol. 283. - No. 22. – P. 15349–15358.
632. Axonal transport defects in neurodegenerative diseases / G. A. Morfini, M. Burns, L. I. Binder [et al.] // *J. Neurosci.* - 2009. – Vol. 29, Iss. 41. – P. 12776-12786.
633. Hozumi I. Brain Injury and Growth Inhibitory Factor (GIF)—a Minireview / I. Hozumi, T. Inuzuka and S. Tsuji. // *Neurochemical Research* - 1998 – Vol. 23, No 3. – P. 319-328
634. Enomoto H. Regulation of neural development by glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands. / Enomoto H. // *Anat Sci Int.* - 2005 - № 80(1) – P. 42-52.
635. Ronald K.H. Liem. Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease / Ronald K.H. Liem and Albee Messing // *The*

ЛИТЕРАТУРА

- Journal of Clinical Investigation - 2009 – Vol. 119, No 7 – P. 1814-1824
636. Defective Functioning of Metallothionein Protein (MT) and Toxic Metal Sensitivity, Pfeiffer Treatment Clinic, Dr. W. Walsh et al. 2001. www.flcv.com/ptcmt.html
637. Dhawan N. In search of a treatment for Alzheimer's disease and potential immunosuppressive therapeutic interventions. / N. Dhawan, J. Puangco, R. Jandial // *Neuro Endocrinol Lett.* - 2008 - № 29(4) – P. 410-420.
638. Paula Grammas Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease *Journal of Neuroinflammation.* 2011. № 8. – P. 26
639. Neuroproteomics: expression profiling of the brain's proteomes in health and disease. / Kim S. I., Voshol H., van Oostrum J. [et al.] // *Neurochem Res.* - 2004 - № 29(6) – P. 1317-1331.
640. Squier T. C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging / T. C. Squier // *Exp. Gerontol.* - 2001. – Vol. 36, No. 9. – P.1539-1550.
641. Radford S.E. Towards an understanding of the structural molecular mechanism of beta(2)-microglobulin amyloid formation in vitro / S. E. Radford, W. S. Gosal, G. W. Platt // *Biochim Biophys Acta.* - 2005 - № 1753(1) – P. 51-63.
642. Chatani E. Structural stability of amyloid fibrils of beta(2)-microglobulin in comparison with its native fold /E. Chatani, Y. Goto/ *Biochim Biophys Acta.* - 2005 - № 1753(1) – P. 64-75.
643. Eng L. F. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000) / Eng L. F., Ghirnikar R. S., Lee Y. L. // *Neurochem. Res.* - 2000 - № 25(9-10) – P. 1439-1451.
644. Expression patterns of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta in epilepsy-associated lesional pathologies / Martinian L., Boer K., Middeldorp J. [et al.] // *Neuropathol Appl Neurobiol.* - 2009 - № 35(4) – P. 394-405.
645. Regulation of metallothionein-III (GIF) mRNA in the brain of patients with Alzheimer disease is not impaired / Amoureux M. C., Van Gool D., Herrero M.T. [et al.] // *Mol. Chem. Neuropathol.* - 1997. – Vol. 32, No. 1-3. – P. 101-121.
646. Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease / S. Peng, D. J. Garzon, M. Marchese [et al.] // *J. Neurosci.*

- 2009. – Vol. 29, Iss. 29. – P. 9321-9329.
647. Luheshi L. M. Bridging the gap: from protein misfolding to protein misfolding diseases / Luheshi L. M., Dobson C. M. // FEBS Lett. - 2009. - № 583(16) - P. 2581-2586.
648. The interaction of β^2 -crystallin with mature β -synuclein amyloid fibrils inhibits their elongation / C. A. Waudby, T.P. Knowles, G.L. Devlin [et al.] // Biophys J. - 2010 - № 98(5) – P. 843-851.
649. Castillo V. Amyloidogenic Regions and Interaction Surfaces Overlap in Globular Proteins Related to Conformational Diseases / V. Castillo, S. Ventura. // PLoS Computational Biology | www.ploscompbiol.org. – 2009. – Vol. 5. – Iss. 8. – P. 1-16.
650. Age-related changes in expression of metallothionein-III in rat brain / Miyazaki I., Asanuma M., Higashi Y. [et al.] // Neurosci. Res. - 2002. – Vol. 43. – No. 4. - P. 323-333.
651. Localization, regulation, and function of metallothionein-III/growth inhibitory factor in the brain / C. A. Sogawa, M. Asanuma, N. Sogawa [et al.] // Acta Med. Okayama - 2001. – Vol. 55. – No. 1. – P. 1-9.
652. Meloni G. Redox activity of β -synuclein-Cu is silenced by Zn²⁺ - metallothionein-3. // G. Meloni, M. Вальбк // Free Radic Biol Med. - 2011 - № 50(11) – P. 1471-1479.
653. Association of metallothionein-III with oligodendroglial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. / Pountney D.L., Dickson T.C., Power J.H. [et al.] // Neurotox Res. – 2011. -№ 19(1) – P. 115-122.
654. Шток В. Н. Экстрапирамидные расстройства: Руководство по диагностике и лечению / Шток В.Н., Иванова-Смоленская И.А., Левин О.С. – М.: МЕДпресс-информ.- 2002 – 608 с.
655. Olanow C. W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. / C. W. Olanow // Neurology – 1996. – Vol. 47 – P. S161-S170
656. Катунина, Елена Анатольевна. Фармакологические способы коррекции двигательных нарушений при болезни Паркинсона (экспериментально-клиническое исследование): Дис. ...д-ра мед. наук : спец. 14.00.25 : Москва, 2005. 212 С.
657. Голубев В. Л. Болезнь Паркинсона и синдром паркинсонизма. / Голубев В. Л., Левин Я.И., Вейн А. М. — М.: МЕДпресс 1999. — 416 с.
658. Гехт А. Б. Антиоксидантная терапия в неврологической практике / А. Б. Гехт, Э. Ю. Соловьева, В. Б. Чепцов // Здоров'я

ЛИТЕРАТУРА

- України. – 2006. – № 17. – С. 27-28.
659. Ahlskog J. E. Parkinson's Disease Treatment Guide for Physicians/ J. Eric Ahlskog -USA: Oxford University Press, 2009 – 382 p.
660. Stewart A. Parkinson's disease: diagnosis and clinical management/ Stewart A. Factor, William J. Weiner- Demos Medical Publishing, 2007 – 819 p.
661. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. / Jomova K., Vondrakova D., Lawson M. [et al.] // Mol Cell Biochem. - 2010 - № 345(1-2) – P. 91-104.
662. Foley P. The motor circuit of the human basal ganglia reconsidered / P. Foley, P. Riederer // J Neural Transm Suppl – 2000 – Vol. 58 – P. 97-110.
663. Nass R. Parkinson's Disease: Molecular and Therapeutic Insights from Model Systems / Richard Nass, Serge Przedborski - ACADEMIC PRESS, 2008 – 686 p.
664. Aschner M. The role of MT in neurological disorders /M. Aschner, A.K. West // J. Alzheimers Dis. - 2005. – Vol. 8, No. 2. – P. 139-145.
665. Nielsen A.E. The Balance between Life and Death of Cells: Roles of Metallothioneins / A. E. Nielsen, A. Bohr, M. Penkowa // Biomark. Insights. - 2007. – Vol. 7, No. 1. – P. 99-111.
666. Зайчик А. Ш. Общая патофизиология : [учебник для студентов медВУЗов] / А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов – С-Пб. : ЭЛБИ, 2001. Том 1. – 2001. – 624 с.
667. Фільченков О. О. Апоптоз і рак: від теорії до практики. / О. О. Фільченков, Р. С. Стойка // Тернопіль: ТДМУ, 2006. – 524 С.
668. Давыдовский И.В. Общая патология человека. – 2-е изд., доп. и перераб. – М.: Медицина, 1969. – С. 156-176.
669. Itoh N. Cytokine-induced metallothionein expression and modulation of cytokine expression by metallothionein / N. Itoh, T. Kimura // Yakugaku Zasshi - 2007. – Vol. 127, Iss. 4. – P. 685-694.
670. Activin A levels are associated with abnormal glucose regulation in patients with myocardial infarction: potential counteracting effects of activin a on inflammation / Andersen G.Ш., Ueland T., Knudsen E.C. [et al.] // Diabetes, 2011. – Vol. 60. – Iss. 5. – P. 1544-1551.
671. Mariani E. Effect of zinc supplementation on plasma IL-6 and MCP-1 production and NK cell function in healthy elderly: interactive influence of +647 MT1a and -174 IL-6 polymorphic alleles /E. Mariani, S. Neri, L. Cattini // Exp. Gerontol. - 2008. - №43(5) –P. 462-471.

672. Uptake of silver from metallic silver surfaces induces cell death and a pro-inflammatory response in cultured J774 macrophages / L. J. Locht, K. Smidt, J. Rungby [et al.] // *Histol. Histopathol.* – 2011- № 26(6) – P. 689-697.
673. Scivolino P. J. Regulation of metallothionein gene expression by TNF-alpha and IFN-beta in human fibroblasts / Scivolino P. J., Vilcek J. // *Цитокине.* - 1995 - № 7(3) – P. 242-250.
674. Шафран Л.М. Апоптоз как общий механизм физиологии и патологии клетки и его роль в современной токсикологии // *Бюлетень VI читань ім. В.В. Подвисоцького, присвячених до 150-річчя з дня народження. 31 травня-1червня 2007 року.* – Одесса, 2007. - С. 39-42
675. Martinez M.M. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques / M. M.Martinez, R. D. Reif, D. Pappas // *Anal. Methods* – 2010- № 2 – P. 996–1004
676. Gentamicin Causes Apoptosis at Low Concentrations in Renal LLC-PK1 Cells Subjected to Electroporation / Helene Servais, Yves Jossin, Françoise Van Bambeke[et al.] // *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* - 2006. - №4 - P. 1213–1221.
677. Leptin reduces gentamicin-induced apoptosis in rat renal tubular cells via the PI3K-Akt signaling pathway / Chen Y.C., Chen C.H., Hsu Y.H. [et al.] // *Eur J Pharmacol.* - 2011 - № 658(2-3) – P. 213-218.
678. Myrtle A. Davis. Apoptosis in the Kidney Myrtle / A. Davis and Dara H. Ryan // *Toxicol Pathol* – 1998. - № 26 – P. 810
679. Gentamicin-induced apoptosis in renal cell lines and embryonic rat fibroblasts. / El Mouedden, M., G. Laurent, M. P. Mingeot-Leclercq [et al.] // *Toxicol. Sci.* - 2000. - № 56 – P. 229–239.
680. Mechanism of apoptosis induced by a lysosomotropic agent, L-Leucyl-L-Leucine methyl ester. / Uchimoto T., Nohara H., Kamehara R. [et al.] // *Apoptosis.* - 1999 - № 4(5) – P. 357-362.
681. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. / Katarina Kegehal, Ming Zhao, Irène Svensson [et al.] // *Biochem. J.* – 2001 - № 359 – P.335–343.
682. Reactive oxygen species-producing site in radiation and hydrogen peroxide-induced apoptosis of human peripheral T cells: involvement of lysosomal membrane destabilization. / Ogawa Y. [et al.] // *Int Mol Med* - № 13 – P. 655-660.
683. Guicciardi M.E. Apoptosis as a mechanism for liver disease progression. / Guicciardi M.E., Gores G.J. // *Semin Liver Dis.* –

ЛИТЕРАТУРА

2010. - № 30(4) – P. 402-410.
684. Klaassen C.D. Metallothionein protection of cadmium toxicity / C. D. Klaassen, J. Liu , B. A. Diwan // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 2009. – Vol. 238, No. 3. – P. 215-220.
685. Expression of kidney injury molecule-1 (Kim-1) in relation to necrosis and apoptosis during the early stages of Cd-induced proximal tubule injury / W. C. Prozialeck, J. R. Edwards [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* - 2009. – Vol. 238, No. 3. – P. 306-314.
686. Kidney injury molecule-1 is an early noninvasive indicator for donor brain death-induced injury prior to kidney transplantation. / W. N. Nijboer, T. A. Schuurs, J. Damman [et al.] // *Am J Transplant* - 2009. - № 9 – P. 1752–1759.
687. Nickolas T. L. Biomarkers in acute and chronic kidney disease / T. L. Nickolas, J. Barasch, P. Devarajan // *Curr Opin Nephrol Hypertens* – 2008 - № 17 – P. 127–132.
688. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis / E. Daugas, S. A. Susin, N. Zamzami et al. // *FASEB J.* - 2000. – Vol. 14, Iss. 8. – P. 729–739.
689. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis / Krysko D.V., Vanden Berghe T., D’Herde K. [et al.] // *Methods.* - 2008 - № 44(3) – P. 205-221.
690. MTH-A19. Senescence, Apoptosis or Autophagy? / Vicencio J.M., Galluzzi L., Tajeddine N. [et al.] // *Gerontology* – 2008 - № 54 – P. 92–99.
691. Silva MT. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program / M. T.Silva // *FEBS Lett.* - 2010 - № 584(22) – P. 4491-4499.
692. Ho E. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkappa B, and AP1 DNA binding and affects DNA repair in a rat glioma cell line. / Ho E. and Ames B. N. // *Proc Natl Acad Sci USA*- 2002 - № 99 – P. 16770–16775.
693. Mitochondrio-Nuclear Translocation of AIF in Apoptosis and Necrosis / Daugas E., Susin S.A., Zamzami N. [et al.] // *FASEB J.* - 2000. – Vol. 14. – P. 729–739.
694. Jiang L.-J. The ATP–metallothionein complex / Jiang L.-J., Maret W., Vallee B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 1998. - Vol. 95. – P. 9146–9149.
695. Sanchez-Nino M.D. TNF Superfamily: A Growing Saga of Kidney Injury Modulators / M. D. Sanchez-Nino, A. Benito-Martin, S. Goncalves // Hindawi Publishing Corporation. *Mediators of*

- Inflammation. - Volume 2010, Article ID 182958, 11 pages.
doi:10.1155/2010/182958
696. NF- κ B in renal inflammation / A. B. Sanz, M. D. Sanchez-Niño, A. M. Ramos [et al.] // J. Amer. Soc. Nephrol. - 2010. - Vol. 21, No. 8. - P. 1254–1262.
697. Papouli E. Overexpression of metallothionein-II sensitizes rodent cells to apoptosis induced by DNA cross-linking agent through inhibition of NF-kappa B activation. / E. Papouli, M. Defais, F. Larminat // J. Biol. Chem. - 2002. – № 277. – P. 4764–4769.
698. Metallothionein and apoptosis in the toxic milk mutant mouse / Deng D.X., Ono S., Koropatnick J. [et al.] // Lab Invest. - 1998 - № 78(2) – P. 175-183.
699. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. / I. G.Ganley, H. Lam du, J.Wang [et al.] // J Biol Chem – 2009 -№ 284 –P. 12297-12305.
700. Fn14-Fc Fusion Protein Regulates Atherosclerosis in ApoE-/- Mice and Inhibits Macrophage Lipid Uptake In Vitro. / Kitty Schapira, Linda C Burkly, Timothy S Zheng [et al.] // Arterioscl Throm Vas - 2009 - № 29(12)- P. 2021-2027.
701. Rhein protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. / Y. L. Zhao, G. D. Zhou, H. B. Yang [et al.] // Food Chem Toxicol. - 2011 Apr 15. [Epub ahead of print]
702. Inactivation of GSK-3 β by Metallothionein Prevents Diabetes-Related Changes in Cardiac Energy Metabolism, Inflammation, Nitrosative Damage, and Remodeling. / Yuehui Wang, Wenke Feng, Wanli Xue [et al.] // Diabetes – 2009. – Vol. 58, Issue: 6, - P. 1391-1402
703. Cherian M.G. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis / Cherian M.G., Jayasurya A., Bay B.H. [et al.] / Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen. - 2003. – Vol. 533. – P. 201-209.
704. Metallothioneine expression as prognostic factor for transitional cell carcinoma. / Yamasaki Y., Smith C., Weisz D. [et al.] // Urology. - 2006 - № 67(3) – P. 530-535.
705. Clinicopathological study of metallothionein immunohistochemical expression, in benign, borderline and malignant ovarian epithelial tumors / Zagorianakou N., Stefannou D., Macrydimas G. [et al.] / Histol. Histopathol. - 2006. – Vol. 21. – P. 341-347.
706. Metallothionein immunoexpression in oral leukoplakia. / Johann A.C. da Silveira-Junior J.B., Souto G.R., Horta M.C. [et al.] // Med.

ЛИТЕРАТУРА

- Oral Pathol., Oral Cir. Bucal. - 2008. – Vol.13. – E156-E160
707. Metallothionein expression in human neoplasia / Theocharis S. E., Margeli A. P., Klijanienko J. T. [et al.] // *Histopathology* - 2004. – Vol. 45. - P. 103–118.
708. Metallothionein - overexpression as a highly significant prognostic factor in melanoma: a prospective study on 1270 patients / Weinlich G., Eisendle K., Hassler E. [et al.] // *Br. J. Cancer* - 2006. – Vol. 94, No. 9. – P. 835-841.
709. Апоптоз і рак: від теорії до практики. – Тернопіль: ТДМУ, 2006. – 524 с.
710. Metallothioneins and Cancer / Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J. [et al.] // *Curr. Protein Pept. Sci.* - 2009. – Vol. 10, No. 4. – P. 360-375.
711. Theocharis S. Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer / Theocharis S., Margeli A., Koutselinis A. // *Int. J. Biol. Markers* – 2003 - Vol. 18. – P. 162–169.
712. Prognostic significance of metallothionein in human gastrointestinal cancer / Janssen A.M.L., van Duijn W. [et al.] // *Clin. Cancer Res.* - 2002. – Vol. 8, No. 6. – P. 1889-1896.
713. Cisplatin-resistant bladder carcinoma cells: enhanced expression of metallothioneins / Siegmund M. J., Marx C., Seemann O. [et al.] // *Urol. Res.* - 1999. - Vol. 27. – P. 157–163.
714. Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancers having a poor prognosis. / Sens M.A., Somji S., Garrett S.H. [et al.] // *Am. J. Pathol.* - 2001. - Vol. 159. – P. 21–26.
715. Ronconi L. The Midas touch in cancer chemotherapy: from platinum- to gold-dithiocarbamate complexes / Ronconi L., Fregona D. // *Dalton Trans.*- 2009. – Vol. 48. – P. 10670-10680.
716. Human metallothionein genes: structure of the functional locus at 16q13 / West A. K., Stallings R., Hildebrand C. E. [et al.] // *Genomics* - 1990. - Vol. 8. – P. 513–518.
717. Prognostic significance of the expressions of metallothionein, glutathione-S-transferase-p, and P-glycoprotein in curatively resected gastric cancer. / Monden N., Abe S., Sutoh I., [et al.] // *Oncology (Basel)* - 1997. – Vol. 54. – P. 391–399.
718. Clonal overexpression of metallothionein is induced by somatic mutation in morphologically normal colonic mucosa / Jasani B., Campbell F., Navabi H. [et al.] // *J. Pathol.* - 1998. – Vol. 184. – P. 144–147.
719. Clonal overexpression of metallothionein is induced by somatic

- mutation in morphologically normal colonic mucosa / Jasani B., Campbell F., Navabi H. [et al.] // J. Pathol. - 1998. – Vol. 184. – P. 144–147.
720. Expression of Metallothionein II in Intestinal Metaplasia, Dysplasia, and Gastric Cancer / Ebert M.P.A., Gunther T., Hoffmann J. [et al.] // Cancer Research - 2000. – Vol. 60. – P. 1995–2001.
721. Cagen S. Z. Binding of glutathione-depleting agents to metallothionein. / Cagen S. Z., and Klaassen C. D. // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1980. - Vol. 54 – P. 229-237
722. Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors. / Nartey N., Cherian M. G., Banerjee D. // Am. J. Pathol. - 1987. - Vol. 129 – P. 177–182.
723. Expression of metallothionein II in intestinal metaplasia, dysplasia, and gastric cancer / Ebert M.P., Gunther T., Hoffmann J. [et al.] / Cancer Res. - 2000. – Vol. 60, № 7. - P. 1995-2001.
724. Смулевич В.Б. Профессия и рак. – М.: Медицина, 2000. – 384 с.
725. Beyersmann D. Effects of carcinogenic metals on gene expression / D. Beyersmann // Toxicol Lett. - 2002. – Vol. 127, № 1-3. – P. 63-68.
726. Waalkes M. P. Cadmium carcinogenesis in review. / M. P. Waalkes / J. Inorg. Biochem.– 2000.- Vol. 79. – P. 241–244.
727. Liu J. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis / J. Liu, W. Qu, M. B. Kadiiska // Toxicol. Appl. Pharmacol. - 2009. – Vol. 238, No. 3. - P. 209-214.
728. Joseph P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis / P. Joseph // Toxicol. Appl. Pharmacol. - 2009. – Vol. 238, No. 3. – P. 272-279.
729. Metallothioneins and cancer. / Eckschlager T., Adam V., Hrabeta J. [et al.] // Curr. Protein Pept. Sci. - 2009. – Vol. 10, No. 4. – P. 360-375.
730. Abdel-Mageed A. Antisense down-regulation of metallothionein induces growth arrest and apoptosis in human breast carcinoma cells. / Abdel-Mageed A., Agrawal K.C.// Cancer Gene Ther. – 1997 - № 4 – P. 199–207.
731. Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. / Kondo Y, Rusnak J.M., Hoyt D.G. [et al.] // Mol. Pharmacol. – 1997 - № 52 – P. 195–201.
732. Role of metallothionein in arcinogenesis. / Cherian G., Howell S.B., Imura N. [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1994 -№ 126 – P. 1–5.

ЛИТЕРАТУРА

733. Influence of metallothionein-1 localization on its function. / Levadoux-Martin M, Hesketh J.E., Beattie J.H. [et al.] // *Biochem. J.* - 2001 - № 355 – P. 473–479.
734. Tsangaris G.T. Metallothionein expression prevents apoptosis: a study with antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides in a human T cell line. / G.T.Tsangaris, FTzortzatou-Stathopoulou. // *Anticancer Res.* – 1998 - №18 – P. 2423–2433.
735. Benton M., Rager J.E., Smeester L., Fry R.C. Comparative genomic analyses identify common molecular pathways modulated upon exposure to low doses of arsenic and cadmium. *BMC Genomics* 2011 12:173.
736. Crystal structure of a p53 tumor suppressor–DNA complex: understanding tumorigenic mutations. / Cho Y., Gorina S., Jeffrey P.D. [et al.] // *Science* – 1994 - № 265 – P. 346–355.
737. Coffey A. I. Divalent metal ions induce configurational change in pure, human wild-type p53 tumor suppressor gene. / A. I. Coffey, P. P. Knowles // *Biochim. Biophys. Acta* – 1994 – Vol. 1209 – P. 279–285.
738. Hainaut P. A structural role of metal ions in the ‘wild-type’ conformation of the tumor suppressor protein p53. / P. Hainaut, J. A. Milner // *Cancer Res.* – 1993 - № 53 – P. 1739–1742.
739. Pavletich N. P. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. / N. P. Pavletich, K. A. Chambers, C. O. Pabo // *Genes De Vol.* – 1993 - № 7 – P. 2556–2564.
740. Role of cysteine residues in regulation of p53 function. / Rainwater R., Parks D., Anderson M.E. [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 1995 - № 15 – P. 3892–3903.
741. Meplan C. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. / C. Meplan, M. J. Richard, P. Hainaut // *Oncogene* -2000 - №19 – P. 5227–5236.
742. Барышников А.Ю. Иммунологические проблемы апоптоза. / А.Ю.Барышников, Ю.В. Шишкин – М.: Эскориал УРСС, 2002. – 320 с.
743. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy / Schmitt E., Gehrmann M., Brunet M. [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* - 2007. - Vol. 81. – P. 15–27.
744. Gupta S. Influence of Cell Cycle Checkpoints and p53 Function on the Toxicity of Temozolomide in Human Pancreatic Cancer Cells /

- S. Gupta, S. Sathishkumar, M.M. Ahmed // *Pancreatology* - 2010. – Vol.10, No. 6. – P. 565–579.
745. Differential expression and activation of NF-kappaB family proteins during oral carcinogenesis: Role of high risk human papillomavirus infection /Mishra A., Bharti A.C., Varghese P. [et al.] // *Int J Cancer*. - 2006 - №119(12) – P.2840-50.
746. Karin M. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer /M. Karin // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2009. – Vol. 1, No. 5. – P. 1-14.
747. Curcumin: A Review of Anti-Cancer Properties and Therapeutic Activity in Head & Neck Squamous Cell Carcinoma / Wilken R., Veena M.S., Wang M.B. [et al.] // *Mol. Cancer* - 2011. – Vol.10, No. 1. – P. 12-19.
748. Gilmore T. D. The Rel1/NF-k B/l k B signal transduction pathway and cancer / T. D. Gilmore // *Cancer Treat. Res.* -2003. – Vol. 115. – P. 241–265.
749. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma / Annunziata C. M., Davis R. E., Demchenko Y. [et al.] // *Cancer Cell* - 2007. – Vol. 12. – P. 115–130.
750. Dai R. Despite Inhibition of Nuclear Localization of NF- κ B p65, c-Rel, and RelB, 17- β Estradiol Up-Regulates NF- κ B Signaling in Mouse Splenocytes: The Potential Role of Bcl-31 / R. Dai, R. A. Phillips, S. A. Ahmed // *J Immunol.* – 2007. - № 179 – P. 1776–1783.
751. Differential expression and activation of NF- κ B family proteins during oral carcinogenesis: Role of high risk human papillomavirus infection / Mishra A., Bharti A.C., Varghese P[et al.] // *Int. J. Cancer* - 2006. – Vol. 119. – P. 2840–2850.
752. Decreases of metallothionein and aminopeptidase N in renal cancer tissues / Ishii K., Usui S., Yamamoto H. [et al.] // *J. Biochem.* - 2001. – Vol. 129, No. 3. – P. 253–258.
753. Tumour necrosis factor alpha induces co-ordinated activation of rat GSH synthetic enzymes via nuclear factor kappaB and activator protein-1 / Yang H., Magilnick N., Ou X. [et al.] // *Biochem J.* - 2005. – Vol.391, Pt 2. – P. 399-408.
754. Estrogen regulates transcription factors STAT-1 and NF- κ B to promote inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inflammatory responses / Dai R., Phillips R.A., Karpuzoglu E. [et al.] // *J. Immunol.* - 2009. – Vol. 183, No. 11. – P. 6998–7005.

ЛИТЕРАТУРА

755. Zip4 (Slc39a4) expression is activated in hepatocellular carcinomas and functions to repress apoptosis, enhance cell cycle and increase migration / Weaver B.P., Zhang Y., Hiscox S. [et al.] // *PLoS One*. – 2010. - № 5(10). - pii: e13158.
756. Epinat J.-C. Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF- κ B signal transduction pathway / J.-C. Epinat, T. D. Gilmore / *Oncogene* - 1999. – Vol. 18. – P. 6896-6909.
757. Jasani B. Significance of metallothionein overexpression in human tumours / B. Jasani, K. W. Schmid // *Histopathology* – 1997. -№ 31 - 211–214.
758. Basal metallothionein in tumors: widespread presence of apoprotein / Pattanaik A., Shaw C.F., Petering D.H. [et al.] // *J. Inorg. Biochem.* - 1994. - Vol. 54. – P. 91–105.
759. Theocharis S.E. Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer / S. E. Theocharis, A.P. Margeli, A. Koutselinis / *Int. J. Biol. Markers* - 2003. – Vol.18, No. 3. – P.162-169.
760. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляторная патология. / Г.Н. Крыжановский – М.: Рит-Экспресс, 21002. – 96 с.
761. Скальный А.В. Химические элементы: биологическая роль в организме человека, классификация и современные концепции. – В кн.: Биоэлементный статус населения Беларуси: экологические, физиологические и патологические аспекты / Под ред. Н.А. Гресь, А.В. Скального. – Минск: Харвест, 2011. -С. 11-34.
762. Liu J. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis / J. Liu , W. Qu, M. B. Kadiiska // *Toxicol Appl Pharmacol.* - 2009 - № 238(3) – P. 209-214.
763. Changes in pro/antioxidant balance in smoking and non-smoking pregnant women with intrauterine growth restriction / Bizos A., Milnerowicz-Nabzdyk E., Zalewska M. [et al.] // *Reprod Toxicol.* - 2011 - № 32(3) – P. 360-367.
764. Большой Д.В. Определение содержания ртути в биосубстратах моряков, экспонированных парами металлической ртути во время рейса. / Д. В. Большой, Е. Г. Пыхтеева // *Актуальні питання гігієни та екологічної безпеки України. Другі марзеєвські читання. Київ, 2006.* – С. 179-180
765. Stennard F. A. Effect of prior, low-level cadmium exposure in vivo on metallothionein expression in cultured lymphocytes / F.A.Stennard, T.C. Stewart, A.K. West // *Journal of Applied Toxicology* – 1995.– Vol. 15, № 1- P. 63-67.

766. The Relationships of Urinary Metallothionein with Other Indicators of Renal Dysfunction in People Living in a Cadmium-Polluted Area in Japan. / Tohyama C., Mitane Y., Kobayashi E. [et al.] // Journal of Applied Toxicology. – 1988. - Vol. 8, No. 1 – P. 15-21.
767. Biological monitoring for occupational cadmium exposure – P. the urinary metallothionein / Z. A. Shaikh, K. J. Ellis, K.S. Subramanian [et al.] // Toxicology. – 1990.-Vol. 63, № 1 – P. 53-62.
768. Dose-response relationship between dietary cadmium intake and metallothioneinuria in a population from a cadmium-polluted area of Japan/ Teruhiko Kido, Zahir A. Shaikh, Hideaki Kito [et al.] // Toxicology – 1991 - Vol. 66, Issue 3 - P. 271-278.
769. Prevalence of metallothioneinuria among the population living in the Kakehashi River basin in Japan—an epidemiological study/ Z.A. Shaikh, T. Kido, H. Kito [et al.] // Toxicology – 1990.-Vol. 64, № 1- P. 59-69.
770. Excretion of urinary cadmium, copper, and zinc in cadmium-exposed and nonexposed subjects, with special reference to urinary excretion of beta2-microglobulin and metallothionein. / Nakajima M., Kobayashi E., Suwazono Y. [et al.] // Biol Trace Elem Res. - 2005 - № 108(1-3) – P. 17-31.
771. Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes from cadmium-exposed workers. / Lu J., Jin T., Nordberg G. [et al.] // Cell Stress Chaperones. - 2001. - № 6(2) – P. 97-104.
772. Metallothionein I isoform mRNA expression in peripheral lymphocytes as a biomarker for occupational cadmium exposure. / Chang X., Jin T., Chen L. [et al.] // Exp Biol Med - 2009. - № 234(6) – P. 666-672.
773. Glutathione-S-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in Austria / Gundacker C., Komarnicki G., Jagiello P. [et al.] // Sci Total Environ. – 2007. - № 385(1-3). – P. 37-47.
774. A new diagnostic method for chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma based on serum metallothionein, copper, and zinc levels / Nakayama A., Fukuda H., Ebara M. [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2002.– № 25(4). – P. 426-431
775. Ann M. Coulston. Nutrition in the prevention and treatment of disease / Ann M. Coulston, Carol Boushey - London: Elsevier Academic Press, 2008 - 898 C.
776. Metallothionein expression in the central nervous system of multiple sclerosis patients. / Penkowa M., Espejo C., Ortega-Aznar A. [et al.] // Cell Mol Life Sci. - 2003 - № 60(6) – P. 1258-1266.

ЛИТЕРАТУРА

777. Cadmium promotes breast cancer cell proliferation by potentiating the interaction between ERalpha and c-Jun / Siewit C. L., Gengler B., Vegas E. [et al.] // *Mol Endocrinol.* - 2010 - № 24(5) – P. 981-992.
778. Jarup L. Current status of cadmium as an environmental health problem. / L. Jarup, A. Akesson - *Toxicology and Applied Pharmacology* – 2009 - № 238 – P. 201-208.
779. Joseph P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis / P. Joseph // *Toxicol Appl Pharmacol.* - 2009 - № 238(3 – P. 272-279.
780. Comparative genomic analyses identify common molecular pathways modulated upon exposure to low doses of arsenic and cadmium / Benton M. A., Rager J. E., Smeester L. [et al.] // *BMC Genomics.* - 2011 - №12 – P.173-179.
781. Thirumoorthy N. A Review of Metallothionein Isoforms and their Role in Pathophysiology / N. Thirumoorthy¹, A. S. Sunder, K.T.M. Kumar, M. S. Kumar, GNK Ganesh, M. Chatterjee. // *World Journal of Surgical Oncology* – 2011. - No. 9. – P. 54-61.
782. Sharma S. Therapeutic Potential of Metallothioneins antiinflammatory Agents in Poysubstance Abuse / S. Sharma , M. Ebadi // *IIOABJ* - 2011. – Vol. 2, Iss. 6. – P. 50-61.
783. Borghesi L.A. Stress proteins as agents of immunological change: some lessons from metallothionein. / L. A. Borghesi, M. A. Lynes // *Cell Stress Chaperones.* - 1996 - №1(2) – P. 99-108.
784. Zinc antagonizes homocysteine-induced fetal heart defects in rats. / He X., Hong X., Zeng F.[et al.] // *Cardiovasc Toxicol.* - 2009 - № 9(3) – P. 151-159.
785. Tomashov-Matar R. The involvement of Src family kinases (SFKs) in the events leading to resumption of meiosis / Tomashov-Matar R., Levi M., Shalgi R. // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2008. – Vol. 282, Iss. 1-2. – P. 56-62.
786. Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in Mammalian eggs /Kim A. M., Bernhardt M. L., Kong B.Y. [et al.] // *ACS Chem. Biol.* - 2011. – Vol. 6-7, – Iss. 8. – P. 716-723.
787. Palmiter R.D. Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter / R.D. Palmiter // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2004 - № 101(14) – P. 4918-4923.

Шафран Л.М., Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В. Металлотионеины / Под редакцией проф. Л.М. Шафрана – Одесса: Издательство "Чорномор'я", 2011. – 428 с.

Редактор Л.М.Шафран
Макет, дизайн, вёрстка — Д.В.Большой
Обложка — Е.С.Шитко

Підписано до друку 08.12.2012.

Друк офсетний. Тираж 200 екз. Замовлення 276.

Видавництво "Чорномор'я"
65076, Одеса, майдан Незалежності, 1

Надруковано в типографії ТОВ "Арт-В"
65091, м. Одеса, вул. Комітетська, 24 а.