

УДК 546.47.3.96:616.61.612.07

## МЕТАЛЛОТИОНЕИН: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ

### 2. РОЛЬ МЕТАЛЛОТИОНЕИНА В ЗАЩИТЕ ОТ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА

*Пыхтеева Е.Г.*

*Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса*

**Ключевые слова:** *металлотионеин, оксидативный стресс*

#### Введение

Процессы образования активных форм кислорода происходят в организме и в норме и при патологии. Нарушение баланса между образованием активных форм кислорода (радикалов, перекисных соединений) и резервной способностью клетки к активации антиоксидантной системы клеток (АОС) приводит к возникновению патологических процессов. АОС клетки представлена низкомолекулярными соединениями – ловушками радикалов (витамины А, С, Е и К, биофлавоноиды, низкомолекулярные тиолы (глутатион и эрготионеин)), а также антиперекисными ферментами (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, каталаза и т.д.).

Активация АОС вызывает приспособление (адаптацию) организма к новым 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.

В силу наличия большого числа SH-связей, способных к достаточно легкому окислению, металлотионеин выступает активным антиоксидантом

#### Актуальность проблемы

Понимание процессов, позволяющих клетке справиться с эндогенным или экзогенным оксидативным стрессом, имеет большое теоретическое и практическое значение, т.к. может помочь не только при лечении, но и при диагностике различных патологических состояний.

#### Материалы и методы исследований

Проведен литературный поиск и анализ экспериментов, описанных в литературе за последние 10 лет.

#### Результаты и их обсуждение

Металлотионеин – низкомолекулярный (6-7 кДа) цистеинсодержащий белок (до 30 процентов аминокислот – цистеин), не содержит в своем составе ароматических аминокислот [1].

Современный взгляд на строение МТн, его роль в транспорте эссенциальных металлов (цинка и меди) и детоксикации токсичных металлов (кадмия, ртути и др.) подробно изложен в статье [2].

Известно, что один из механизмов, которым химические вещества вызывают клеточное повреждение выступает формирование активных форм кислорода. Исследование *in vitro* показало, что МТн может поглощать реактивные разновидности кис-

лорода, особенно гидроксильные радикалы. Однако не известно, действительно ли МТн защищает животных от окислительного стресса. Экспериментальная индукция МТн могла бы разъяснить этот вопрос, однако, неясно, влияют ли индукторы МТн также на известные антиоксидантные системы. Таким образом, основная сложность экспериментальных исследований антиоксидантных свойств МТн *in vivo* состоит в невозможности выделить количественный вклад этого низкомолекулярного белка в общий антиоксидантный ответ организма. Наиболее простым подходом является сравнение ответа АОС обычных и 0-МТн мышей (т.е. генетически модифицированных мышей, у которых отсутствует ген синтеза металлотионеина) на одинаковое воздействие, приводящее к оксидативному стрессу.

Проведено масштабное исследование для определения влияния известных индукторов МТн на другие антиоксидантные ферменты печени, которые защищают клетки от окислительного стресса. Самцам крыс вводили хлорид кадмия (30 мкмоль/кг, s.c.), хлорид цинка (1000 мкмоль/кг, s.c.), альфа-гедерин (АГ, 30 мкмоль/кг, s.c.) или липополисахарид (ЛПС; 1 мг/кг, s.c.) за 24 часа до измерения активности антиоксидантной системы. Цинк и альфа-гедерин вызывали рост концентрации глутатиона в печени на 20 % и 55 %, соответственно. Cd значительно увеличивал, а липополисахарид уменьшал активность селен-зависимой глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы. На активность глутатион-трансферазы не влиял ни один из индукторов. Кадмий, цинк и альфа-гедерин снижали активность каталазы на 20-35 %, в то время как активность СОД не изменялась при воздействии индукторов. Общее количество ферментов цитохрома

P450 и цитохром b5 снижалось при действии липополисахаридов, кадмия и Cd и альфа-гедерина, и практически не изменялось при действии цинка. Активность ферментов P450, измеренная по окислению тестостерона, также уменьшалась при действии липополисахаридов, кадмия и альфа-гедерина. Т.о. все четыре исследованных индуктора МТн воздействуют на системы защиты клетки от окислительного стресса. Поэтому трудно, используя эти химические вещества, определить *in vivo* роль МТн в защите от окислительного стресса [3].

В то же время в работе [4] 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 выше. В клетках 0-МТн мышей был значительно повышен уровень продуктов ПОЛ, что свидетельствует о том, что МТн важен для защиты клетки от повреждающего действия свободных радикалов.

Кроме того показано, что при инициированном кадмием окислительном стрессе существует два основных пути реакции организма – экспрессия генов синтеза МТн и глутатиона [5].

Из 5000 публикаций, которые находит поисковая система Medline по слову «металлотионеин», около 50 рефератов были посвящены защитной роли МТн при воздействии ионизации и ультрафиолетового облучения. Известно, что одним из путей патогенеза при воздействии УФ-облучения и ионизации выступает оксидативный стресс. В литературе существуют данные, свидетельствующие об индуктивном синтезе МТн в ответ на воздействие УФ-света или ионизирующего излучения. В обзоре [6], крити-

чески оценены данные относительно вызванного радиацией синтеза МТн, и поставлена под сомнение потенциальная роль МТн в защите клеток от радиационного повреждения. Несмотря на то, что описана экспрессия мРНК МТн или синтез МТн, вызванный экспозицией клеток *in vitro* или тканей *in vivo* ионизацией или ультрафиолетовым облучением, в большинстве исследований на животных и культурах тканей для индукции МТн использовались большие дозы ионизирующей радиации, то есть эти данные трудно экстраполировать на многократные низкоуровневые воздействия радиации на людей. Несмотря на это индуцированный синтез МТн сегодня рассматривается как один из механизмов, включающихся в процессы адаптации, как реакция на экспозицию низкой дозой радиации. По мнению авторов [6], МТн, в норме содержащийся в неповрежденных клетках, может защитить их от генотоксичности и цитотоксичности радиационного облучения. Однако в опухолевых клетках наличие МТн может привести также к повышенной устойчивости к лекарственным средствам и радиационной обработке. Эти эффекты модулируются также и другими клеточными факторами, помимо МТн, такими как антиоксиданты и регуляторы на различных стадиях клеточного цикла при пролиферации и дифференцировании клеток. Данные о защитной роли МТн в вызванном облучением апоптозе в тимусе мыши подтверждены также авторами [7]. С этими данными корреспондируются данные [8]. В их эксперименте опытным мышам перед облучением вводили азотно-кислый висмут. При этом наблюдалась повышенная устойчивость клеток костного мозга к токсическим воздействиям облучения гамма-лучами опытных мышей по сравнению с контрольными. У опытных мышей выросла концентрация МТн в клетках

костного мозга, но уровни других клеточных антиоксидантов, таких как каталаза, СОД, глутатион-трансфераза, глутатион-пероксидаза и глутатион были неизменны. На основании данных исследователями сделан вывод о возможности использовать данные о концентрации МТн при определении чувствительности животных к облучению гамма-лучами.

Известно, что окислительный стресс может быть вызван тяжелым тепловым шоком при воздействии высоких температур. Регистрируемое при этом драматическое повышение синтеза МТн-I может быть одним из важных компенсаторных механизмов естественной системы послеожоговой защиты [9].

В работе [10] доказана антиокислительная роль МТн III, который как правило находится в мозге, и продемонстрировано, что МТн III может поглощать свободные радикалы кислорода и защищать клетки от оксидативного стресса.

Данные о том, что МТн могут выступать как антиоксиданты, приведены также в работах [11, 12].

Интересное практическое применение МТн предложено в работе [13]. Поскольку МТн содержит большое количество цистеина, он может функционировать как антиоксидант, а следовательно в перспективе возможно его использование в качестве фармацевтического средства для лечения печени от повреждений, вызванных оксидативным стрессом от применения алкоголя. Для целей защиты кожи от вредного воздействия активных форм кислорода предложено использовать МТн в косметических омолаживающих кремах.

Механизм антиоксидантного действия МТн на сегодня до конца не выяснен. В одной из последних работ [14] на основании данных, получен-

ных *in vitro*, показано, что в условиях окислительного стресса МТн теряет цинк. К такому изменению в строении МТн приводит окисление сульфгидрильных групп с формированием дисульфидной связи. Эти исследования проведены *in vitro* на культуре клеток. Чтобы проверить, реализуется ли подобный механизм *in vivo*, проводили опыты на трансгенных мышах с повышенной экспрессией генов МТн. Для индуцирования окислительного стресса использовали доксорубин (20 мг/кг), который является эффективным лекарственным средством против рака, но вызывает повреждение сердца из-за усиленной генерации активного кислорода. Из гомогената ткани сердца экстрагировали соединения, содержащие остатки цистеина, после их дифференциального алкилирования. Свободные и связанные с металлом цистеины были сначала связаны *N*-этилмалеимидом, затем дисульфидные связи восстанавливали дитиотреитолом, что сопровождалось алкилированием йодацетамидом с меченым радиоактивным изотопом йода. Исследования дифференцированно алкилированных МТн из экстракта гомогената сердца методами ВЖХ и масс-спектрометрии показали, что дисульфидные связи присутствовали в МТн *in vivo* и при физиологических условиях и при окислительном стрессе. Однако в условиях окислительного стресса дисульфидных связей было значительно больше. Дисульфидные связи МТн были вероятны внутримолекулярными, причем в формировании дисульфидной связи включались  $\alpha$ - и  $\beta$ -домены. При этом  $\alpha$ -домен окислялся легче, чем  $\beta$ -домен. Результаты позволяют предположить, что в физиологических условиях формирование межмолекулярных дисульфидных связей у МТн включается при поддержании гомеостаза цинка. Дополнительное выделение цинка из МТн в усло-

виях окислительного стресса сопровождается формированием большого количества дисульфидных связей в МТн.

Способность МТн защищать от окислительного стресса сердечную мышцу показана теми же авторами в эксперименте *in vivo* [15, 16] на трансгенных мышах с повышенной экспрессией МТн. При остром и хроническом окислительном стрессе (введение доксорубина, постишемическая реперфузия, обедненная медью диета) у трансгенных мышей с повышенной экспрессией МТн в сердце отмечена повышенная устойчивость к этим вредным факторам, по сравнению с обычными мышами. Эта устойчивость проявлялась на биохимическом, патолого-гистологическом и функциональном уровне. Защитное действие МТн коррелирует с его способностью к ингибированию реактивного кислорода, который является одним из продуктов перекисного окисления липидов. Критическое разъяснение механизма антиоксидантного действия МТн *in vivo* еще впереди и требует дополнительных исследований. Однако сделана попытка анализа этого механизма на основе новых данных о строении цинкового кластера МТн и новых молекулярно-генетических подходов.

Эти исследования расширены в работе [17, 18]. Исследовали кардиомиопатии, вызываемые активными формами кислорода у трансгенных мышей с повышенной экспрессией МТн и врожденным диабетом (линия OVE26MT). Мыши линии OVE26 с трансгенным диабетом показали кардиомиопатию, характеризующуюся значительно измененным синтезом мРНК, морфологическими отклонениями и сниженной сократимостью при ишемическом состоянии. Сердца крыс с врожденным диабетом находились в состоянии окислительного

стресса, что проявлялось в повышении уровня окисленного глутатиона. Мыши с врожденным диабетом с повышенным кардиальным МТн (линия OVE26MT) были получены скрещиванием OVE26 трансгенных мышей с МТн трансгенными мышами. 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 сердца были морфологически нормальными. Повышение уровня МТн улучшило ослабленную ишемическую сократимость, наблюдаемую в диабетических сердцах. Эти результаты показывают, что специфическая экспрессия синтеза МТн (белка-антиоксиданта) в кардиомиоците уменьшает повреждение сердца при диабете. Похожие наблюдения описаны в работе [19], в которой дополнительно учитывались половые различия. Авторы [20] 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 [21] для этих же целей использовали превентивное введение цинка. Результаты исследований в этой области предложено применять для людей, страдающих диабетом второго типа [22.].

### Выводы

Анализ литературных данных за последние 10 лет позволяет сделать вывод, что металлотионеин не только осуществляет детоксикацию и участвует в поддержании гомеостаза металлов, но также играет важную роль в связывании свободных радикалов

во время окислительного повреждения. Особенно важна в этом смысле роль МТн-4, который содержится в мозге, обеспечивая его антиоксидантную защиту в комплексе других АОС организма.

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 или активных форм кислорода.

### Литература

1. Miles A.T., Hawksworth G.M., Beattie J.H., Rodilla V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. - *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* - V 35 - N 1 - P 35-70 - 2000
2. Пыхтеева Е.Г. Металлотионеин: биологические функции. Роль металлотионеина в транспорте металлов в организме - *Ж. Актуальные проблемы транспортной медицины* - №4- С.44-57.- 2009 г.
3. M.B.Iszard, J.Liu, C.D.Klaassen// Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats// *Toxicology* – V. 104, № 1-3 – P. 25-33 – 1995.
4. Y.Suzuki, M.D.Apostolova, M.G.Chерian// Astrocyte cultures from transgenic mice to study the role of metallothionein in cytotoxicity of tert-butyl hydroperoxide / *Toxicology* – V. 145, №1- P. 51-62 – 2000.
5. Ursula Wimmer, Ying Wang, Oleg Georgiev and Walter Schaffner//

- Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse – P. MTF-1/metallothioneins and glutathione – *Nucleic Acids Research* – № 33(18) – P. 5715-5727 – 2005.
6. L.Cai, M.Satoh, C. Tohyama, Cherian, M.G.// Metallothionein in radiation exposure – P. its induction and protective role – *Toxicology.* – V. 132, № 2-3 – P. 85-98 – 1999.
  7. D.X.Deng, L.Cai, S.Chakrabarti, M.G.Cherian// Increased radiation-induced apoptosis in mouse thymus in the absence of metallothionein – *Toxicology.* –V. 134, № 1 – P. 39-49 – 1999.
  8. N.Miura, M. Satoh, N. Imura, A. Naganuma// Protective effect of bismuth nitrate against injury to the bone marrow by gamma-irradiation in mice – P. possible involvement of induction of metallothionein synthesis – *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – V. 286, № 3- P. 1427-1430 – 1998
  9. 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.
  10. 1. You H.J., Lee K.J., Jeong H.G./ / Overexpression of human metallothionein-III prevents hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human fibroblasts. – *FEBS Lett.* – V.521(1-3) – P.175-179 – 2002.
  11. 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.
  12. Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C., Rofe A.M. //Metallothionein – P. the multipurpose protein. – *Cell. Mol. Life Sci.* – №59(4) – P.627-647 – 2002.
  13. Zhou Z., Sun X., James K.// Metallothionein Protection against Alcoholic Liver Injury through Inhibition of Oxidative Stress./*Exp Biol Med (Maywood)* – V.227(3) – P. 214-22 – 2002.
  14. 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.
  15. Y. James Kang. The Antioxidant Function of Metallothionein in the Heart – *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* – V. 222 – P.263-273 – 1999.
  16. Y. James Kang, Yan Chen, Anding Yu, Mildred Voss-McCowan, Paul N. Epstein// Overexpression of Metallothionein in the Heart of Transgenic Mice Suppresses Doxorubicin Cardiotoxicity – *J. Clin. Invest.* – V. 100, № 6 – P.1501-1506 – 1997.
  17. L. Cai, J. Wang, Y. Li, X. Sun, L. Wang, Z. Zhou, and Y. J. Kang / Inhibition of Superoxide Generation and Associated Nitrosative Damage Is Involved in Metallothionein Prevention of Diabetic Cardiomyopathy – *Diabetes.*- V.54(6) – P.1829 – 1837. – 2005.
  18. Qiangrong Liang, Edward C. Carlson, Rajakumar V. Donthi, Patrica M. Kralik, Xia Shen, and Paul N. Epstein // Overexpression of Metallothionein Reduces Diabetic Cardiomyopathy – *Diabetes.* – V.51

– P.174-181 – 2002.

19. A. F. Ceylan-Isik, K. H. LaCour, and J. Ren//Sex difference in cardiomyocyte function in normal and metallothionein transgenic mice – P. the effect of diabetes mellitus – J. Appl. Physiol – V.100(5) –P. 1638-1646. – 2006.
20. Ayaz and B. Turan// Selenium prevents diabetes-induced alterations in  $[Zn^{2+}]_i$  and metallothionein level of rat heart via restoration of cell redox cycle. – Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – V. 290(3). – P.1071 – 1080. – 2006.
21. J. Wang, Y. Song, L. Elsherif, Z. Song, G. Zhou, S. D. Prabhu, J. T. Saari, and L. Cai//Cardiac Metallothionein Induction Plays the Major Role in the Prevention of Diabetic Cardiomyopathy by Zinc Supplementation – Circulation. – V. 113(4) –P. 544 – 554. – 2006.
22. C. Scheede-Bergdahl, M. Penkowa, J. Hidalgo, D. B. Olsen, P. Schjerling, C. Prats, R. Boushel, and F. Dela//Metallothionein-Mediated Antioxidant Defense System and Its Response to Exercise Training Are Impaired in Human Type 2 Diabetes – Diabetes. – V. 54(11) – P.3089 – 3094. – 2005.

### Резюме

#### МЕТАЛЛОТІОНЕЇН: БІОЛОГІЧНІ ФУНКЦІЇ

#### 2. РОЛЬ МЕТАЛЛОТІОНЕЇНУ В ЗАХИСТІ ВІД ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ

*Пихтєєва О.Г.*

Проведений аналіз літературних даних за останні 15 років про механізми антиокисантної активності металлотіонеїна. Критично оцінені результати проведених експериментів. Показано, що металлотіонеїн здатний поглинати активні форми кисню, при цьому окислюючись і частково полімеризуючись з вивільненням цинку.

### Summary

#### METALLOTIONEIN: BIOLOGICAL FUNCTIONS

#### 2. ROLE OF METALLOTIONEIN IN PROTECTIV FROM OXIDATIVE STRESS

*Pykhtyeyeva E.G.*

The scientific articles are considered for the last 15 years about the mechanisms of activity of metallothionein on oxidative stress. The results of the conducted experiments are critically appraised. It is rotined that is Metallothionein to be in a position to take in the active forms of oxygen. Metallothionein's SH-group oxidize and he is partly polymerized with freeing of zinc.

*Впервые поступила в редакцию 15.03.2010 г.*

*Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*