

ОСОБЛИВОСТІ МОЛЕКУЛЯРНОЇ СТРУКТУРИ ТА ФУНКЦІЙ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ У ЦЕНТРАЛЬНІЙ НЕРВОВІЙ СИСТЕМІ

Надійшов 22.09.09

В огляді наведені сучасні уявлення про структуру та принципи класифікації низькомолекулярних білків, здатних до зв'язування з іонами металів, – металотіонеїнів (МТ). Охарактеризований механізм зв'язування металів з цими біополімерами, розглянуті головні функції МТ у ЦНС, їх роль у захисних реакціях нервових та інших клітин й організму в цілому.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: металотіонеїни, цинк, ЦНС, захисні реакції.

У даному огляді розглянуто головні функції металотіонеїнів (МТ) у ЦНС. Показано, що в умовах *in vivo* ці специфічні білки можуть зв'язувати Zn^{2+} , Cu^{+} , Cd^{2+} та Hg^{2+} ; у той же час в умовах *in vitro* перелік іонів металів, що можуть зв'язуватися з молекулами МТ, є значно ширшим. У фізіологічних умовах МТ у головному мозку ссавців зв'язані з іонами цинку. Тому, очевидно, варто навести відомості про вміст цього металу в організмі та окремих тканинах.

ВМІСТ ЦИНКУ В ОРГАНІЗМІ ЛЮДИНИ ТА БІОЛОГІЧНА РОЛЬ ЦЬОГО МЕТАЛУ

Загальна кількість цинку в організмі людини становить від 0.5 до 3 г (отже, за формальними критеріями цинк, як і залізо, не зовсім відповідає терміну „мікроелемент”) [1]. При цьому в крові міститься лише 1 % загальної кількості цинку в цілому організмі; решта ж даного мікроелемента зосереджена в інших тканинах. У сироватці крові здорової людини концентрація вказаного металу складає в середньому 12–20 мкМ, причому приблизно 70 % цинку зв'язані з альбумінами. Кількість цинку в мозку в цілому порівняно невелика і в середньому складає 5 мг/100 г сухої речовини. Цинк розподілений у різних ділянках кори та підкоркових ядрах голов-

ного мозку людини відносно рівномірно. Ізольовані ядра нервових клітин сірої речовини кори головного мозку людини містять у собі 0.1 % цинку.

Доросла людина повинна споживати цинк у кількості 15–25 мг на добу. При дефіциті цього металу спостерігаються гіпогаммаглобулінемія, гіпогонадизм (особливо в чоловіків), карликовість, порушення темної зорової адаптації, поява на шкірі хронічних язв, пригнічення процесів репарації клітин, розвиток імунодефіциту, хронічна уремія (порушення хемотаксису гранулоцитів), розвиток неврологічних захворювань [2–6].

У наш час відомо близько 200 цинкзалежних металоферментів та білків. До них належать РНК-полімераза, карбоангідраза, фактори транскрипції, оксидоредуктази, трансферази, ліази та гідролази, ізомерази, цитозольні форми супероксиддисмутази. Цинк може зв'язуватися з молекулами низки гормонів – фолікулостимулюючого, лютетінізуючого, тестостерону, інсуліну.

Вважається, що цинк, з'єднуючись із тільними групами білків, зв'язується з фосфатною частиною фосфоліпідів або взаємодіє з карбоксильними групами сілової кислоти та білками плазматичних мембран, змінюючи такі їх характеристики, як розчинність та стабільність. Цинк є інгібітором мембранних ферментів – кальційзалежної аденозинтрифосфатази (АТФ-ази) та фосфоліпази А2. Цинк також бере участь у синтезі ДНК, здійснюючи стимуляцію ферментів та змінюючи зв'язування гістонів з ДНК [6].

У забезпеченні клітинного імунітету цей метал

¹Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара (Україна).

Ел. пошта: ushakova_g@ukr.net (Г. О. Ушакова).

також відіграє важливу роль. У разі дефіциту цинку або МТ знижується кількість та порушуються функції Т-хелперів і натуральних кілерів, спостерігаються атрофія тімуса та лімфопенія [5, 6].

Привертає увагу здатність іонів цього металу модулювати активність НМДА-рецепторів – однієї з найважливіших груп іонотропних глутаматних рецепторів, котрі беруть участь у процесах синаптичної передачі [7]. Цинк взаємодіє з багатьма не-трансмiтерними рецепторами, але вплив на НМДА-рецептори викликає особливу цікавість, оскільки даний метал здатний накопичуватися в синаптичних пухирцях глутаматергічних нервових терміналей. Цинк вивільнюється під час синаптичної активації, і його концентрація в синаптичній щілині може зростати до мікромольних значень. Вважають, що вплив цинку на НМДА-рецептори є подвійним. З одного боку, це потенціалзалежне гальмування за рахунок конкуренції Zn з Mg. Крім того, гальмування може бути і потенціалнезалежним за рахунок зв'язування цинку з певними іншими центрами рецептора [8]. Надлишкове накопичення Zn у нейронах справляє цитотоксичну дію та індукує загибель нейронів, характерну для багатьох неврологічних патологій. Результати деяких досліджень показали, що надходження Zn до нейронів посилюється під дією глутамату та гальмується НМДА-антагоністами. Ця група фактів підтверджує механізм накопичення вказаного металу в нервовій тканині саме за рахунок його концентрації в структурах з НМДА-рецепторами. Женг та співавт. висловили припущення, що впливи Zn та Src-тирозинкінази на НМДА-рецептори є протилежними [9]. Вважають, що Src-індукована потенціація активації НМДА-рецепторів може бути пов'язана із зняттям цинкіндукованого гальмування. НМДА-рецептори активуються за рахунок зв'язування гліцину з NR1-субодиницею та глутамату – з NR2A-субодиницею. Zn гальмує роботу рецептора, зменшуючи час його відкритого стану. Взаємодія Src з цитоплазматичним доменом NR2A індукує конформаційні зміни, котрі запобігають зв'язуванню Zn в екстрацелюлярному домені, тим самим потенціюючи активацію рецептора. Проте щодо роботи цього механізму в умовах *in vivo* залишається ще багато неясних питань, адже існує дуже багато комбінацій субодиниць даних рецепторів із різним ступенем афінності до відповідних лігандів.

Оскільки цинк є мікроелементом, критичним для багатьох біохімічних та фізіологічних процесів, гомеостаз вмісту зазначеного металу повинен чітко

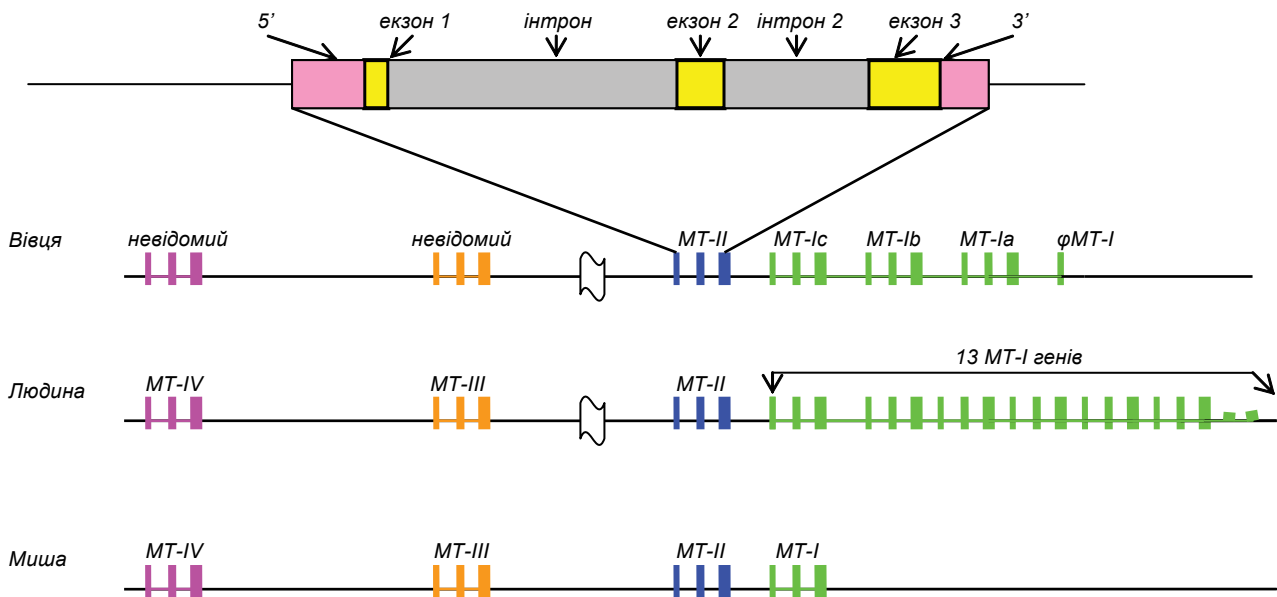
контролюватися на всіх рівнях регуляції, включаючи кожен індивідуальну клітину. Згідно з припущенням Хірано та співавт., Zn (як і Ca) може діяти як сигнальний агент, що запускає як мінімум два сигнальні шляхи. Це „пізня” Zn-сигналізація, яка залежить від зміни експресії транспортерів цинку, та „рання” Zn-сигналізація, яка безпосередньо індукується дією позаклітинних стимулів [5]. Гомеостаз Zn є результатом координованого метаболізму багатьох білків, що забезпечують його захоплення, транспорт та збереження всередині клітини. Більшість з цих білків відносяться до мембранних транспортерів (родини ZIP та ZnT) та МТ [4–6].

ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ СТРУКТУРИ МТ

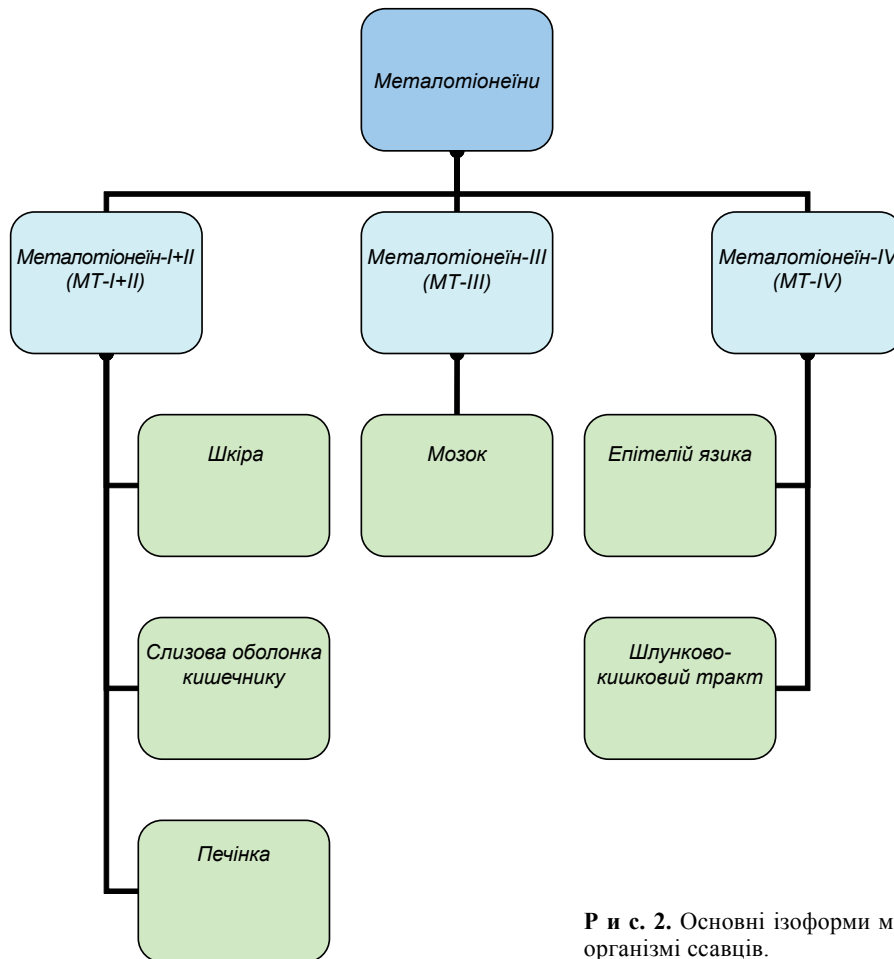
У пошуках сполук, котрі відповідають за природну акумуляцію двовалентних металів у клітинах нирок ссавців, у 1957 р. Валлі та співавт. [10] ідентифікували родину низькомолекулярних протеїнів, локалізованих у цитоплазмі та ядрі, та назвали їх МТ. Молекули МТ складаються із 61–68 амінокислотних залишків, 20 з котрих є висококонсервативними залишками цистеїну. Ці молекули не мають дисульфідних „містків” та не вміщують залишків ароматичних амінокислот і гістидину. Цистеїнові залишки зібрані в унікальних послідовностях Cys-X-Cys, Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-X-Cys (де X не є залишком Cys). Молекулярна маса даних білків становить 6.5–7 кДа. МТ виявляють чималий рівень поліморфізму; при цьому їм притаманний винятковий ряд гомології, що свідчить про високу консервативність первинної структури даних протеїнів. Розташування генів білків МТ у різних видів ссавців представлено на рис. 1 [11]. Висока консервативність структури МТ у процесі еволюції та їх широке поширення вказує на важливу фундаментальну фізіологічну функцію цих протеїнів, незважаючи на те, що природа МТ та їх роль ще є матеріалом для обговорювань та суперечок.

КЛАСИФІКАЦІЯ МТ

На сьогодні відомі чотири ізоформи МТ – МТ-I та МТ-II, котрі містяться в покривних тканинах – шкірі [12, 13] та слизовій оболонці кишковика [14], а також у печінці [15], МТ-III з локалізацією в мозку [16, 17] та МТ-IV, що зустрічаються в епітелії



Р и с. 1. Розташування генів, що визначають експресію металотіонінів (MT), у хромосомах різних видів ссавців.



Р и с. 2. Основні ізоформи металотіонінів та їх локалізація в організмі ссавців.

язика та шлунково-кишкового тракту [18] (рис. 2). Більше 17 підтипів МТ були виділені за допомогою хроматографії, але тільки для десятих із них пропонується та або інша гіпотетична функція в організмі людини.

Білок МТ-III, відомий як інгібітор фактора росту клітин ЦНС, був відкритий у 1991 р. [17]. Треба відзначити, що даний білок у мозку щура інколи представляють як складову частину великого мультиферментного комплексу. До вказаного комплексу входять також креатинкіназа та дигідропіримидиназоподібний білок 2 [19]. Це дозволило розширити можливий спектр функцій білка МТ-III у ЦНС. Крім того, результати робіт останнього десятиріччя показали, що гени *MT-I* та *MT-II* експресуються в багатьох тканинах, у тому числі і в ЦНС, тоді як експресія генів *MT-III* та *MT-IV* має чітку клітинну специфічність [4, 5, 20].

У дорослих тварин мРНК *MT-I+II* та МТ-білки представлені в мозку у фізіологічних умовах у малих кількостях; під час ембріонального розвитку та в неонатальний період їх вміст є помітно більшим. МТ підвищують свою імунореактивність протягом постнатального періоду та набувають широкого розповсюдження в ЦНС. Основним джерелом МТ у мозку є астроцити, хоча цей білок знайдений також в епітелії хороїдального сплетіння нервів, ендотелії та менінгеальних клітинах. Дані щодо вмісту МТ у нейронах неоднозначні, хоча вказується, що комплекс *MT-I+II* забезпечує захист нейронів в умовах культури [21, 22].

МЕХАНІЗМ ЗВ'ЯЗУВАННЯ МЕТАЛІВ

МТ мають велику здатність до зв'язування з металами (7–10 моль металів на 1 моль МТ) [23]. Експериментально доведено, що цистеїнові залишки не є безпосередньо металзв'язуючими лігандами; кожний іон металу стає „вмонтованим” у тетраедричний комплекс чотирьох тіолових лігандів. Результати досліджень з використанням ЯМР-спектроскопії показали, що сім металів (серед них Cd, Zn, Cu, Ag), які асоціюються з МТ, зв'язуються двома кластерами – чотирьохатомним кластером А та трьохатомним кластером В. Поява атома металу в кластері А супроводжується кооперативно появою іонів у кластері В. Порядок звільнення молекул МТ від металу йде зворотним шляхом. Коли зв'язується Cu, координаційна „упаковка”, вірогідно, є іншою, і тут залучається більше атомів на один моль.

Ця відмінність поки що є предметом дискусій.

Для розуміння механізму зв'язування металів молекулами МТ важливо знати точну структуру активного центру даного білка. За допомогою методів рентгенівської дифракції було виявлено, що Cd-Zn-МТ складається з двох глобул – α та β . Об'єднання двох доменів відбувається за рахунок збагаченої лізином ділянки. α -Домен С-термінального кінця (амінокислотні залишки 32–61 у МТ-II щура) має 11 цистеїнових залишків та може зв'язувати чотири атоми двовалентних або шість атомів моновалентних металів, у той час як N-термінальний β -домен (амінокислотні залишки 1–31) має дев'ять цистеїнових залишків та здатний зв'язати три двовалентні або шість моновалентних атомів металів. Коли до апотіонеїну приєднуються атоми металів, поліпептидний ланцюг швидко набуває вторинної структури. Тривимірні тіолові кластери є в усіх доменах молекул МТ [6, 17]. Особливістю структури МТ-III (68 амінокислотних залишків) є дві вставки: залишок треоніну на N-термінальному кінці та гексопептид – на С-кінці [17].

РЕГУЛЯЦІЯ МЕТАБОЛІЗМУ МТ

Біосинтез МТ контролюється багатьма факторами. Один з головних – це індукція металами [23–29]. Вважають, що мідь та інші метали замінюють цинк в існуючих МТ-комплексах, а тому цинкактивуючі промотори генів цього білка вивільнюються знову. Антитіла щодо очищених МТ викликають появу преципітату з МТ. Виняткова індукційна здатність їх при впливі важких металів наводить на думку про необхідність ретельного дослідження генної експресії цих білків. Ще одним важливим фактором є аліментарний контроль. Коли аліментарне надходження цинку та міді збільшується, біосинтез МТ (насамперед у печінці та кишковому) ініціюється або посилюється, що є одним з безпосередніх механізмів детоксикації. Кері та співавт. [28] виявили індукцію синтезу МТ також при дії ліпополісахариду, який може виділятися при аборті та дії тератогенних факторів. Метаболізм МТ є дуже чутливим до гормональної регуляції під дією глюкокортикоїдів, катехоламінів, глюкагону, стероїдів, інтерлейкіну-6, ангіотензину-2, 2-бутил цАМФ та форболового ефіру, стресорних факторів (білків “гострої” фази стресу) та інших медіаторів [29–35].

МТ можуть піддаватися відносно швидкій деградації. Експозиція тривалістю 24 год є достатньою

для зменшення пула МТ-зв'язаного цинку. Час напівжиття цинкіндукованого МТ знаходиться в межах 18–24 год [15, 31], тоді як кадмій-цинкзв'язуючий (2:1) МТ має період напівжиття 3.5 доби. Кадмій може залишатися зв'язаним з даними білками протягом місяця. Головне місце деградації МТ – це лізосоми [15].

ФУНКЦІЇ МТ У ЦНС

На сьогодні отримано багато результатів щодо структури та функцій металзв'язуючих білків, але слід визнати, що цих даних ще замало для інтегральної інтерпретації молекулярних механізмів участі вказаних білків у нормі та при дії шкідливих факторів на ЦНС [3, 5, 27, 36–38].

Як було відмічено вище, першою формою МТ, специфічною для ЦНС, було визначено МТ-III. За допомогою імуногістохімічних методів була виявлена локалізація як МТ-III, так і МТ-I+II в мозку мишей та щурів (гліальні клітини, павутинна та м'яка оболонка головного мозку, ендотеліальні клітини, епітелій судинного сплетіння). Порівняно висока кількість мРНК МТ-III спостерігалася в корі головного мозку, гіпокампі, мигдалеподібному тілі, мозочку, нюхових цибулинах. Кількість МТ у мозку дорослих організмів є значно більшою, ніж така у молодих [11, 21]. Ці білки сприяють збільшенню кількості клітин епітелію судинного сплетіння та епендимальних клітин.

Слід мати на увазі, що акумуляція іонів металів у надлишкових кількостях безпосередньо в мозку призводить до розвитку оксидативного стресу та, кінець кінцем, нейродегенеративних хвороб. На сьогодні вважають встановленим, що головною функцією МТ є детоксикація щодо важких металів (Cd, Hg, Ag, Au, Pt), опосередкована функціонуванням гемато-енцефалічного та гемато-лікворного бар'єрів [11, 22].

Показано, що дія Cd викликає п'ятиразове збільшення індукції МТ; під впливом Hg та Ag індукція цього білка лімфоцитами зростає в 4.1 та 3.0 рази (при дозах уведення всіх згаданих металів 10 мкмоль). Серед менш токсичних металів найсильнішим індуктором експресії МТ є цинк (у 9.5 разу при дозі введення металу 200 мкмоль). Олово, залізо, кобальт та марганець не викликають індукції синтезу тіонеїнів або справляють дуже слабкі ефекти [39].

Генна індукція синтезу МТ іонами Zn^{2+} відбува-

ється одночасно з індукцією транспортера-I (Zn -TI). Така індукція зумовлена дією металрегулюючого транскрипційного фактора (MTF-I), але механізм активації цього фактора, що впливає на МТ-гени, досі детально не з'ясований. Показано, що активований ген експресує апо-МТ, котрий зв'язує цинк з високим ступенем афінності ($R_d = 10^{-12}$ M). В умовах дефіциту цинку металзв'язуючий транскрипційний фактор-1 може формувати комплекс із Zn -відповідним інгібітором (МТ-транскрипційним інгібітором), що блокує взаємодію металзв'язуючого транскрипційного фактора-1 з металзв'язуючими елементами [40–42].

На сьогодні залишається багато питань щодо характеру індукції МТ у ЦНС. На відміну від даних про інші органи та тканини (особливо печінку, де має місце майже лінійна залежність індукції біосинтезу МТ від концентрації іонів металів) свідчення щодо ЦНС є інколи зовсім розбіжними. У роботі Затта та співавт. [21] було показано, що акумуляція іонів металів у мозку теляти (вісім–16 місяців) та дорослої тварини (дев'ять–12 років) має значні відмінності (концентрація Cu збільшується з 1.67 до 15.7, Zn – із 6.13 до 17.07 мкг/г сухої церебральної тканини). У той самий час результати імунохімічних досліджень не продемонстрували вірогідної вікової різниці розподілу МТ у мозку піддослідних тварин.

Згідно з даними наших досліджень, наявність МТ-I+II у мозку щурів після тривалої кадмієвої інтоксикації (інгаляції 0.1 %-вого розчину $CdCl_2$ тривалістю 1 год двічі на тиждень протягом 19 тижнів) є відмінною у різних відділах мозку. Отримані результати не показали різкого збільшення експресії МТ-I+II у досліджуваних відділах мозку під впливом такої інтоксикації [43]. Виявилось навіть, що рівень МТ у гіпокампі через три тижні після тривалої інгаляційної інтоксикації 0.1 %-вим $CdCl_2$ знижувався більш ніж у чотири рази. Рівень МТ-I+II у корі великих півкуль при цьому зменшувався в 1.5 разу порівняно з таким у контрольній групі, проте вірогідно не змінювався в мозочку й таламусі/гіпоталамусі. Ці дані дозволяють припустити, що довгострокова інтоксикація кадмієм може виснажити біосинтетичні ресурси МТ-I+II або призвести до реорганізації металзахисних механізмів в астроцитах, і такі процеси у різних структурах мозку характеризуються значною специфікою.

Останнім часом Мінами та співавт. [44] встановили, що індукція синтезу МТ у мозку миші після ін'єкцій тімерсолу (етилмеркурію, поширено-

го ртутного консерванта, котрий використовується для збереження вакцин) у невеликих дозах є структуроспецифічною; більш того, ця індукція залежить від складу ін'єкційної суміші (з ліпополісахаридами або без них) та часу дії препарату. Показано, що експресія мРНК МТ-I у мозочку та корі півкуль головного мозку підвищується через 6 та 9 год після введення тімерсолу (12 мкг/кг) відповідно, а рівень експресії МТ у мозочку є в три рази вищим, ніж у корі. Зміни експресії МТ-III та МТ-II у корі в даному експерименті не було зареєстровано.

МТ ЯК ФАКТОРИ, ЩО ЗАБЕЗПЕЧУЮТЬ ЗАХИСТ ВІД ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ

Показано, що МТ здатні захищати клітини ЦНС у разі виникнення або інтенсифікації вільнорадикальних процесів. Механізм зниження рівня перекисного окиснення ліпідів може бути пов'язаний з прямою дією тіольних груп МТ чи із здатністю МТ відновлювати пул тіольних груп, який виснажувався в результаті введення індуктора такого окиснення. Іншими словами, токсичність епоксидів, а також їх можливість зв'язуватися з глутатіоном знижуються, внаслідок чого рівень глутатіону нормалізується [45, 46].

Гоц та співавт. [47] показали, що індукція МТ посилюється під дією оксиду азоту. Було запропоновано гіпотезу щодо механізму дії МТ в умовах індукції перекисного окиснення під впливом аномально високого рівня глюкози (оксидативний стрес у разі розвитку цукрового діабету) [14]. Автори цитованої роботи прийшли до висновку, що МТ захищають як ендотеліальні, так і нервові клітини від окисного стресу, підвищують експресію цитокінів, тромбіну та ендотеліну-I. Була виявлена значна роль МТ в активації та реорганізації цитоскелета клітин ЦНС, та запропонований новий механізм транскрипційного контролю МТ, опосередкованого блокуванням рецептора ендотеліну-I [14].

Тканини мозку є дуже чутливими до окислювального стресу, оскільки потребують найбільшого надходження кисню. Такі тканини характеризуються високою швидкістю аеробного метаболізму, а також містять у собі велику кількість ненасичених жирних кислот (при цьому активність традиційних антиоксидантних систем у даних тканинах порівняно низька). Можливо, саме тому МТ і складають одну з важливих антиоксидантних систем у ЦНС.

Основні напрямки дії МТ у ЦНС в умовах розвитку патологічних станів можна резюмувати наступним чином [48].

В умовах істотного дефіциту МТ-I+II у тканинах ЦНС з'являються макрофаги та лімфоцити. Підвищується інтенсивність продукування низки цитокінів (зокрема, IL-1, IL-6 та TNF- α). Посилюються процеси апоптозу клітин та нейродегенерації. Все це зумовлює появу очевидних клінічних симптомів розвитку патологічного стану і може навіть мати летальні наслідки. У той же час гіперпродукція ізоформ МТ індукує посилення процесів астрогліозу, інтенсифікує синтез протизапальних цитокінів (у NGF, TGF β 1, NT3, NT4-5 та VEGF). У разі пошкодження тканин ЦНС посилюються формування гліальних рубців та ангиогенез. Отже, гіперпродукція МТ-I+II сприяє нейродегенерації та полегшує процеси нейропластичності.

Дослідження останніх років дали докази важливих функцій цинкзалежних механізмів у нервовій системі. Тому кількість робіт з дослідження нейропротекторних можливостей МТ зростає [36–38, 48–54]. Технології генних модифікацій дозволяють вивчати відповідні ефекти як у разі виключення МТ-генів, так і у випадках їх гіперекспресії. Цікавим є той факт, що миші в умовах дефіциту експресії МТ-гена на перший погляд у поведінковому аспекті майже не відрізняються від мишей дикого типу. Проте результати детальних досліджень показали, що МТ-дефіцитні тварини дуже схильні до розвитку нейродегенеративних захворювань; більш того, швидкість та поширеність загибелі нейронів у мишей з дефіцитом МТ значно вищі, ніж у тварин дикого типу [49]. Дефіцит МТ зумовлює обмеження антиоксидантного захисту та, згідно з принципом ланцюгової реакції, веде до активації перекисного окиснення ліпідів, нітрооксидації білків, окиснення ДНК. Такі ефекти разом призводять до масової загибелі нейронів [55, 56].

Навпаки, гіперактивація генів МТ або ін'єкції екзогенного МТ викликають стимуляцію антиоксидантної системи захисту [52, 53], зумовлюють нормалізацію клітинного циклу та посилення проліферації клітин [57]. У таких умовах синтез протизапальних цитокінів посилюється [49, 50], ангиогенез інтенсифікується [58], виживання нейронів підвищується, а процеси відновлення тканин покращуються [36–38, 59–64].

Ефекти впливів МТ дали підстави для пошуку нових методів лікування експериментального аутоімунного енцефаломієліту (ЕАЕ) та розсіяного

склерозу [50, 51]. Враховувалася здатність МТ-I та МТ-II захищати клітини від дії активних форм кисню, пригнічувати апоптоз клітин у ЦНС, сприяти формуванню гліальних рубців при пошкодженні тканин мозку. МТ-I протидіє зменшенню маси мозкової тканини та розвитку судинного набряку, покращує загальний функціональний стан після фокальної церебральної ішемії [63]. У щурів з такою ішемізацією, котрим вводився Zn-МТ у дозі 100 мкг, спостерігалися більша стійкість до розвитку паралічів, ніж у контрольних тварин, та повне одужання на 21–25-й день після ін'єкцій. Щури, яким вводили 300 мкг Zn-МТ, продемонстрували ще кращі результати. Симптоми ЕАЕ у таких тварин були слабшими, ніж у щурів із введенням даного МТ-комплексу в дозі 100 мкг. Вміст МТ у таких щурів виявлявся в позасудинних зонах білої речовини структур стовбура мозку та мозочка. У гліальних клітинах він був відносно високим. У сірій речовині рівень МТ був меншим, ніж у білій.

Уведення екзогенного Zn-МТ пригнічує розвиток мікроглії, тим самим знижуючи кількість круглястих та фагоцитарних макрофагів, а також Т-лімфоцитів (мабуть, це зумовлено зменшенням судинної адгезії та/або пригніченням хемотаксису Т-клітин у ЦНС). Деякі вчені вважають, що Т- та В-клітини мають сайти зв'язування МТ-I та МТ-II на поверхні своїх плазматичних мембран [62]. Цікаво те, що в астроцитів дійсно були знайдені такі сайти [63]. Екзогенний МТ може стимулювати функції астрогліоцитів. Так, МТ-I та МТ-II здатні посилювати міграцію астроцитів після пошкодження астроцитарного моношару [64]. Ймовірно, МТ-I+II здатний демонструвати істотні нейропротекторні властивості, тому що астроглія – це головне джерело трофічних факторів у ЦНС. Реактивація астроцитів потрібна для знищення токсинів та фрагментів пошкоджених клітин, регуляції концентрації різних протеїнів чи іонів у нейропільі, що забезпечує підтримку нейронного гомеостазу. Отже, МТ відіграють важливу роль у регенерації тканини мозку та виникненні гліальних рубців. Також відзначено, що демієлінізація та порушення структури і функції аксонів під час ЕАЕ та при фокальній ішемії є значно більшими в умовах дефіциту МТ-I та МТ-II [50, 51]. У разі ушкодження головного мозку виділяється велика кількість МТ, що пов'язано з окисним стресом [52, 53]. В умовах певних патологій ЦНС МТ-I та МТ-II індують експресію факторів росту bFGF, TGF- β , NT-3 та VEGF-відновлюючого фактора [36–38, 49]. Показано, що МТ можуть іс-

точно регулювати гематопоез у кістковому мозку [62], але механізм цього феномену поки що детально не визначений. Введення Zn-МТ-II знижує рівні інтерлейкіну-6 та фактора некрозу пухлин (TNF), зменшує інтенсивність апоптозу нейронів та олігодендроцитів. Рівень цинку як такий теж може відігравати важливу роль у регуляції апоптозу; зменшення цього показника призводить до пригнічення активності кальційактивуючої ендонуклеази та апоптотичної протеази [58]. Подібні згаданим вище наслідки введення МТ були відзначені у щурів при спостереженні результатів уведення 6-амінонікотинаміду [59, 60].

Вважається, що вплив екзогенного Zn-МТ-II реалізується на основі посилення експресії ендогенного МТ-I. При дії 35 мг/кг каїнової кислоти спостерігається дефіцит МТ-I+II. Це пов'язано з тим, що каїнова кислота відключає ген, відповідальний за експресію даних білків. У ЦНС мишей, що отримували вказану кислоту, відмічались такі прояви, як пошкодження нейронів у гіпокампі, астрогліоз, мікрогліоз, розвиток апоптозу, підвищення концентрації інтерлейкіну-1 та активності каспази-3 [65].

Вторинним ефектом у реалізації нейропротекторних властивостей МТ є регулювання імунних функцій. Результати низки робіт підтверджують можливість використання МТ як регулятора активації NF- κ B [5, 66]. Автори цитованих статей підтвердили наявність спрямованої взаємодії МТ з р50-субодиницею NF- κ B як можливу причину активації цього фактора. МТ також функціонує як імуномодулятор, впливаючи на Т-клітини селезінки *in vivo*.

У системі клітинного імунітету цинк також відіграє важливу роль; при дефіциті МТ відбуваються зниження вмісту цього металу та порушення функції Т-хелперів і натуральних кілерів, виявляються атрофія тімуса та лімфопенія [5].

Результати детальних досліджень вказують на те, що дія МТ не обмежується активуючими впливами на астроцити ЦНС та клітини імунної системи. Так, наприклад, було встановлено, що додавання МТ-I+II у чисту культуру „посттравматичних” нейронів (без глії та імунних клітин) призводить до стимуляції регенерації ушкоджених нервових клітин [67, 68]. Отримані дані свідчать про можливість транспорту МТ з цитоплазми астроцитів до екстрацелюлярного матриксу та безпосередньої дії даних білків на нейрони. У ряді робіт висловлено припущення про рецепторіндукований механізм дії МТ на нейрони, опосередкований мембранним білком мегаліном [69].

Розглядаються можливі застосування введення екзогенного МТ як засобу клінічної терапії. При цьому беруться до уваги здатність МТ зв'язуватися із золотом та платиною [70] та роль цих білків у підтримці гомеостазу цинку та міді [71]. На роль апометалопротеїнів як донорів іонів цинку та міді вказують дані дослідів *in vitro*. Апоензими можуть активуватися в результаті додавання МТ. Zn-МТ реактивує апоформи карбоангідази, лужної фосфатази та альдолази; Cu-МТ активує тирозинкіназу та гемоціанін [71]. Лі та співавт. [72] показали ключову роль індукції р75-NTR іонами цинку в умовах створення в мозку стану ішемічного прекодиціювання (при дії слабого інсульту, що формує в нейронах підвищену резистентність до ефектів великого поширеного інсульту). Автори встановили, що активація каспази-3 протягом ішемічного прекодиціювання є головним фактором нейропротекції й модулюється за рахунок помірної акумуляції цинку та поступової активації р75-NTR у нейронах. У роботі Ямашіта була продемонстрована ефективність застосування екзогенного МТ-I+II для блокування розвитку перігематомного набряку після черепно-мозкової травми [73].

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Аналізуючи дані щодо молекулярної структури та функції МТ, можна зробити висновок, що не тільки нейроспецифічна форма цих білків МТ-III, але й інші їх ізоформи – МТ-I та МТ-II – здатні відігравати важливу роль у захисних реакціях клітин нервової системи та модуляції їх фізіологічних функцій. Результати експериментів підтверджують можливості ефективних впливів зазначених низькомолекулярних білків на регуляцію функціонування як гліальних клітин, так і нейронів. Є підстави вважати, що МТ здатні забезпечувати гальмування продукції запальних цитокінів та брати активну участь у регуляції апоптотичного шляху загибелі клітин. На сьогодні стають досить актуальними дослідження молекулярних механізмів дії МТ як нейропротекторів у ЦНС та з'ясування можливостей їх практичного застосування в даному аспекті.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Г. А. Удрис, Н. Г. Нейланд, *Биологическая роль цинка*, Выш. шк., Рига (1981).
2. J. M. Benson and S. S. Suckman, "Protein deficiency and autism," *Immunology*, **15**, 6247-6254 (1999).
3. S. Ananda, "Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model," *Am. Soc. Clin. Nutr.*, **21**, 403-412 (1991).
4. M. Murakami and T. Hirano, "Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling," *Cancer Sci.*, **99**, No. 8, 1515-1522 (2008).
5. T. Hirano, M. Murakami, T. Fukada, et al., "Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule," *Adv. Immunol.*, **97**, 149-176 (2008).
6. M. Vasak, "Advances in metallothionein structure and functions," *Trace Elem. Med. Biol.*, **19**, 13-17 (2005).
7. М. М. Соловьев, Е. В. Гришин, "Молекулярная организация ионотропных глутаматных рецепторов", *Нейрохимия*, **2**, 154-167 (1997).
8. P. Paoletty, P. Asher, and J. Neyton, "High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors," *J. Neurosci.*, **17**, 5711-5725 (1997).
9. F. Zheng, M. B. Gingrich, S. F. Traynelis, et al., "Tyrosine kinase potentiates NMDA receptor currents by reducing tonic zinc inhibition," *Nature Neurosci.*, **1**, No. 3, 185-191 (1998).
10. B. L. Vallee, W. E. Wacker, A. F. Bartholomay, et al., "Zinc metabolism in hepatic dysfunction. II. Correlation of metabolic patterns with biochemical findings," *New Engl. J. Med.*, **257**, No. 22, 1055-1065 (1957).
11. N. Nishimura, H. Nishimur, A. Ghaffar, et al., "Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse," *Histochem. Soc.*, **40**, 309-315 (1992).
12. L. Danielyan, G. Tolstonog, P. Traub, et al., "Colocalization of glial fibrillary acidic protein, metallothionein, and MHC II in human, rat, NOD/SCID, and nude mouse skin keratinocytes and fibroblasts," *J. Invest. Dermatol.*, **127**, No. 3, 555-563 (2007).
13. D. M. Alschler, D. Biegger, U. Kuhlmann, et al., "Induction of metallothionein in mesothelial cells by zinc," *Artif. Organs*, **31**, No. 6, 488-491 (2007).
14. M. Apostolova, C. Shali, C. Subrata, et al., "High-glucose-induced metallothionein expression in endothelial cells: an endothelin-mediated mechanism," *Physiol. Cell Physiol.*, **21**, 899-907 (2001).
15. R. J. Cousins, "Absorbition, transport and hepatic metabolism of Cu and Zn: special reference to MT and ceruloplasmin," *Physiol. Rev.*, **65**, No. 2, 211-467 (1985).
16. I. Falnoga and M. Skreblin, "The presence of Hg-Zn-Cu thionein in rat brain," *Exp. Neurol.*, **5**, 111-137 (1990).
17. Y. Uchida, K. Takio, K. Titani, et al., "The growth inhibitory factor that deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein," *Neuron*, **7**, 337-347 (1991).
18. C. J. Qife, S. D. Findley, J. C. Erickson, et al., "Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia," *Biochemistry*, **33**, 7250-7259 (1994).
19. D. W. Lahti, J. D. Hoekman, A. M. Tokheim, et al., "Identification of mouse brain proteins associated with isoform 3 of metallothionein," *Protein Sci.*, **4**, 1151-1157 (2005).
20. M. Penkowa, C. Espejo, E. M. Martinez-Caceres, et al., "Increased demyelination and axonal damage in metallothionein I+II-deficient mice during experimental autoimmune encephalomyelitis," *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 185-197 (2003).
21. P. Zatta, D. Drago, P. Zambenedetti, et al., "Accumulation

- of copper and other metal ions, and metallothionein I/II expression in the bovine brain as a function of aging," *J. Chem. Neuroanat.*, **36**, No. 1, 1-5 (2008).
22. H. G. Blaauwgeers, P. A. Sillevius Smitt, J. M. de Jong, et al., "Localization of metallothionein in the mammalian central nervous system," *Biol. Signals*, **3**, No. 4, 181-187 (1994).
 23. I. Bremer and J. Morrison, "Assessment of Zn, Cu and Cd status in animals," *Acta Farmacol. Toxicol.*, **59**, 64-68 (1986).
 24. B. Floriaczyk, J. Osuchowski, R. Kaczmarczyk, et al., "Distribution of metallothioneins in the brain neoplastic cells," *Folia Neuropathol.*, **43**, 91-96 (2005).
 25. S. T. Jacob, S. Majumder, and K. Ghoshal, "Suppression of metallothionein-I/II expression and its probable molecular mechanisms," *Environment. Health Perspectiv.*, **110**, No. 5, 827-830 (2002).
 26. J. Datta, S. Majumder, H. Kutay, et al., "Metallothionein expression is suppressed in primary human hepatocellular carcinomas and is mediated through inactivation of CCAAT/enhancer binding protein alpha by phosphatidylinositol 3-kinase signaling cascade," *Cancer Res.*, **67**, No. 6, 2736-2746 (2007).
 27. F. Chimienti, M. Aouffen, A. Favier, et al., "Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate," *Current Drug Targets*, **4**, No. 4, 323-338 (2003).
 28. L. C. Carey, P. L. Berbee, P. C. Coyle, et al., "Zinc treatment prevents lipopolysaccharide-induced teratogenicity in mice," *Clin. Mol. Teratol.*, **67**, 240-245 (2003).
 29. N. Miura and S. Koizumi, "Heavy metal responses of the human metallothionein isoform genes," *Yakugaku Zasshi.*, **127**, No. 4, 665-673 (2007).
 30. F. Haq, M. Mahoney, and J. Koropatnick, "Signalling events for metallothionein induction," *Mutat. Res.*, **53**, 211-226 (2003).
 31. A. T. Miles, G. M. Hawksworth, J. H. Beattie, et al., "Induction, regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins," *Crit. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 35-70 (2000).
 32. K. E. Rigby Duncan and M. J. Stillman, "Evidence for noncooperative metal binding to the alpha domain of human metallothionein," *FEBS J.*, **274**, No. 9, 2253-2261 (2007).
 33. S. I. Plisov, T. I. Merkulova, L. V. Baranova, et al., "Identification of the glucocorticoid receptor binding site at the 5'-flanking region of mouse metallothionein-I gene: the effect of base substitutions on binding efficiency," *Mol. Biol.*, **24**, 1109-1116 (1990).
 34. S. Suzuki, Y. Masui, M. Ohnuki, et al., "Induction of metallothionein synthesis by cilostazol in mice and in human cultured neuronal cell lines," *Biol. Pharmac. Bull.*, **30**, No. 4, 791-794 (2007).
 35. E. Mocchegiani, R. Giacconi, P. Fattoretti, et al., "Metallothionein isoforms (I+II and III) and interleukin-6 in the hippocampus of old rats: may their concomitant increments lead to neurodegeneration?" *Brain Res. Bull.*, **63**, No. 2, 133-142 (2004).
 36. A. K. West, J. Hidalgo, D. Eddins, et al., "Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition," *Neurotoxicology*, **29**, No. 3, 489-503 (2008).
 37. E. Mocchegiani, C. Bertoni-Freddari, F. Marcellini, et al., "Brain, aging and neurodegeneration: role of zinc ion availability," *Prog. Neurobiol.*, **75**, No. 6, 367-390 (2005).
 38. M. O. Pedersen, R. Jensen, D. S. Pedersen, et al., "Metallothionein-I+II in neuroprotection," *Biofactors*, **35**, No. 4, 315-325 (2009).
 39. L. M. Del Razo and B. Quintanilla-Vega, "Stress proteins induced by arsenic," *Appl. Pharmacol.*, **177**, 132-148 (2001).
 40. R. D. Palmiter, "Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 4918-4923 (2004).
 41. J. Liu, M. Cheng, Q. Yang, et al., "Blood metallothionein transcript as a biomarker for metal sensitivity: low blood metallothionein transcripts in arsenicosis patients from Guizhou, China," *Env. Health. Perspect.*, **115**, 1101-1106 (2007).
 42. F. Otsuka, S. Ohno, K. Suzuki, et al., "Mechanism of metallothionein gene activation mediated by heavy-metal dependent transcription factor MTF-1," *Yakugaku Zasshi*, **127**, 675-684 (2007).
 43. O. Kruchynenko and G. Ushakova, "Effect of chronic intoxication with cadmium on the level of metallothionein in the rat hippocampus," *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **40**, № 5/6, 426-428 (2008).
 44. T. Minami, E. Miyata, Y. Sakamoto, et al., "Induction of metallothionein in mouse cerebellum and cerebrum with low-dose thimerosal injection," *Cell Biol. Toxicol.* (2009).
 45. A. Gow and H. Ischiropoulos, "NO running on MT: regulation of zinc homeostasis by interaction of nitric oxide with metallothionein," *Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*, **28**, 183-184 (2002).
 46. А. Н. Котеров, Н. М. Шилина, "Влияние цинк-металлотионеина на перикисное окисление липидов в плазме крови и в печени мышей при острой алкогольной интоксикации," *Укр. біохім. журн.*, **4**, 80-86 (1995).
 47. K. Min, Y. Terano, S. Onosaka, et al., "Induction of MT synthesis by menadion or carbon tetrachloride is independent of free radical production," *Toxicol. Appl. Pharm.*, **4**, 74-79 (1992).
 48. M. Penkowa, "Metallothionein expression and roles in the central nervous system," *Biomed. Rev.*, **13**, 1-15 (2002).
 49. M. Penkowa, "Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology," *FEBS J.*, **273**, 1857-1870 (2006).
 50. C. Espejo, M. Penkowa, M. Demestre, et al., "Time-course expression of CNS inflammatory, neurodegenerative tissue repair markers and metallothioneins during experimental autoimmune encephalomyelitis," *Neuroscience*, **132**, 1135-1149 (2005).
 51. G. Trendelenburg, K. Prass, J. Priller, et al., "Serial analysis of gene expression identifies metallothionein-II as major neuroprotective gene in mouse focal cerebral ischemia," *Neuroscience*, **22**, 5879-5888 (2002).
 52. J. Hidalgo, M. Penkowa, M. Giral, et al., "Metallothionein expression and oxidative stress in the brain," *Methods Enzymol.*, **348**, 238-249 (2002).
 53. K. S. Min, "Physiological significance of metallothionein in oxidative stress," *Yakugaku Zasshi.*, **127**, No. 4, 695-702 (2007).
 54. M. A. Aras, H. Hara, K. A. Hartnett, et al., "Protein kinase C regulation of neuronal zinc signaling mediates survival during preconditioning," *J. Neurochem.*, **110**, No. 1, 106-117 (2009).
 55. M. Mita, N. Imura, Y. Kumazawa, et al., "Suppressed proliferative response of spleen T cells from metallothionein null mice," *Microbiol. Immunol.*, **46**, 101-107 (2002).
 56. T. M. Leazer, G. P. Daston, C. L. Keen, et al., "The

- embryolethality of lipopolysaccharide in CD-1 and metallothionein I-II null mice: lack of a role for induced zinc deficiency or metallothionein induction," *Toxicol. Sci.*, **73**, 442-447 (2003).
57. M. G. Cherian and M. D. Apostolova, "Nuclear localization of metallothioneins during cell proliferation and differentiation," *Cell Mol. Biol.*, **46**, 347-356 (2000).
58. G. Jia, Y. Gu, K. Chen, et al., "Protective role of metallothionein (I/II) against pathological damage and apoptosis induced by dimethylarsinic acid," *World J. Gastroenterol.*, **10**, 91-95 (2004).
59. M. Penkowa, M. Giralt, J. Comats, et al., "Metallothionein I+II protect the CNS during neuroglial degeneration induced by 6-aminonicotinamide," *Comp. Neurol.*, **444**, 174-189 (2002).
60. M. Penkowa, A. Quintana, J. Carrasco, et al., "Metallothionein prevents neurodegeneration and central nervous system cell death after treatment with gliotoxin 6-aminonicotinamide," *J. Neurosci. Res.*, **77**, 35-53 (2004).
61. R. S. Chung, J. C. Vickers, M. J. Chuah, et al., "Metallothionein-IIA promotes initial neurite elongation and post injury reactive neurite growth and facilitates healing after focal cortical brain injury," *Neuroscience*, **23**, 3336-3342 (2003).
62. M. T. Rahman and M. De Ley, "Metallothionein in human thrombocyte precursors, CD61 (+) megakaryocytes," *Cell Biol. Toxicol.*, **9**, No. 3, 156-162 (2007).
63. M. Giralt, M. Penkova, N. Lago, et al., "Metallothionein I+II protect the CNS after a focal brain injury," *Exp. Neurol.*, **173**, 114-128 (2002).
64. M. Penkowa, C. Espejo, A. Ortega-Aznar, et al., "Metallothionein expression in the central nervous system of multiple sclerosis patients," *Cell Mol. Life Sci.*, **60**, No. 6, 1258-1266 (2003).
65. H. Milnerowicz and M. Slowinska, "Concentration of metals, ceruloplasmin, metallothionein and the activity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and gamma-glutamyltransferase in pregnant women who smoke and in those environmentally exposed to tobacco smoke and in their infants," *Occup. Med. Environ. Health*, **10**, 187-202 (1997).
66. M. Kanekiyo, N. Itoh, A. Kawasaki, et al., "Metallothionein modulates lipopolysaccharide-stimulated tumour factor expression in mouse peritoneal macrophages," *Biochem. J.*, **361**, 363-369 (2002).
67. R. S. Chung, J. C. Viskers, M. I. Chuah, et al., "Metallothionein-III inhibits initial neurite formation in developing neurons as well as postinjury, regenerative neurite sprouting," *Exp. Neurol.*, **178**, 1-12 (2002).
68. R. S. Chung and A. K. West, "A role for extracellular metallothionein in CNS injury and repair," *Neuroscience*, **123**, 595-599 (2004).
69. M. Fitzgerald, P. Nairn, C. A. Bartlett, et al., "Metallothionein-IIA promotes neurite growth via the megalin receptor," *Exp. Brain Res.*, **183**, 171-180 (2007).
70. Y. Shibayama, A. Kawachi, S. Onimaru, et al., "Effect of pretreatment with St John's Wort on nephrotoxicity of cisplatin in rats," *Life Sci.*, **5**, 58-63 (2007).
71. D. K. Chou, Y. Zhao, S. Gao, et al., "Perturbation of copper (Cu) homeostasis and expression of Cu binding proteins in cadmium-resistant lung fibroblasts," *Toxicol. Sci.*, **7**, 504-509 (2000).
72. J. Y. Lee, Y. J. Kim, T. Y. Kim, et al., "Essential role for zinc-triggered p75^{NTR} activation in preconditioning neuroprotection," *J. Neurosci.*, **28**, No. 43, 10919-10927 (2008).
73. S. Yamashita, M. Okauchi, Y. Hua, et al., "Metallothionein and brain injury after intracerebral hemorrhage," *Acta Neurochir.*, **105**, Suppl., 37-40 (2008).