

УДК 618.2 - 008 : 577. 112

РОЛЬ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ ГОМЕОСТАЗА ЦИНКА ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

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

Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса

Эритроцитарный металлотионеин и концентрация цинка в крови могут быть использованы как маркер обеспеченности организма биодоступным цинком, а значительное их превышение выше физиологической нормы может свидетельствовать о перегрузке этим микроэлементом. Обнаружение МТН в моче является маркером почечной дисфункции, вызванной избытком тяжелых металлов. Проведенные исследования показывают, что прием биодобавок (особенно при беременности) должен происходить под контролем врача.

Ключевые слова: эритроцитарный металлотионеин, цинк, беременность

Введение

Металлотионеины (МТН) – семейство многофункциональных белков, которые играют центральную роль в обеспечении гомеостаза металлов и в управлении различными формами стресса [1]. 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), двухкластерной организацией третичной структуры, 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 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:

$\text{Ag} > \text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Co} = \text{Ni}$

[2]. 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 обес-

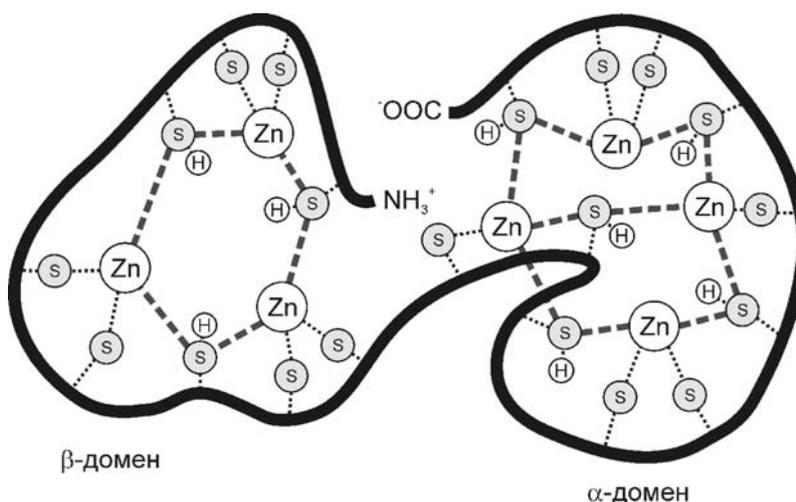


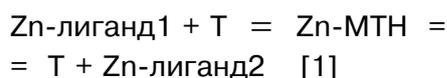
Рис. 1. Схематическое изображение строения Zn-тиолатных кластеров МТН с указанием остатков цистеина. Основано на данных дифракции рентгеновских лучей и ЯМР-спектроскопии [3]. Жирным пунктиром показаны донорно-акцепторные координационные связи между SH-группами цистеина и цинком, тонким пунктиром – ковалентные σ -связи.

печивает выполнение МТН детоксикационной роли. При этом все металлы в ряду, слева от цинка, известны как активные индукторы МТН.

Zn-тиолатные кластеры МТН по свойствам существенно отличаются от любых неорганических комплексов Zn (II). Для МТН характерна, в качестве показателя его клеточных функций, исключительно сильная способность связывать ионы Zn за счет координационных связей металла с цистеином (константа устойчивости $Zn_7\text{МТН-2 } K_{Zn} = 3,2 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ при pH 7,4).

Металлотионеин синтезируется первоначально в виде апопротеина (тионеина), который превращается в МТН путем стехиометрического связывания металлов. Тионеин является мощным акцептором Zn. С другой стороны, сульфгидрильные лиганды высоко реактивны и определяют не только связывание цинка с тионеином, но и его освобождение из МТН [4], 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 ме-

талла в сторону образования комплексов с большей константой устойчивости:



Фундаментальные функции, выполняемые МТН, многочисленны и разнообразны (рис. 2).

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 [2], участие в поддержании гомеостаза важнейших эссенциальных микроэлементов (Zn и Cu), связывание двухвалентных, в том числе токсичных (Cd и Hg), тяжелых металлов, а также участие в антиоксидантной системе [5, 6].

Внутри- и межклеточный транспорт металлов является многокомпонентным процессом, и в его осуществлении МТН принадлежит важная роль [7]. Это относится в первую очередь к транспорту и регуляции гомеостаза цинка [8, 9]. Большинство своих физиологических функций

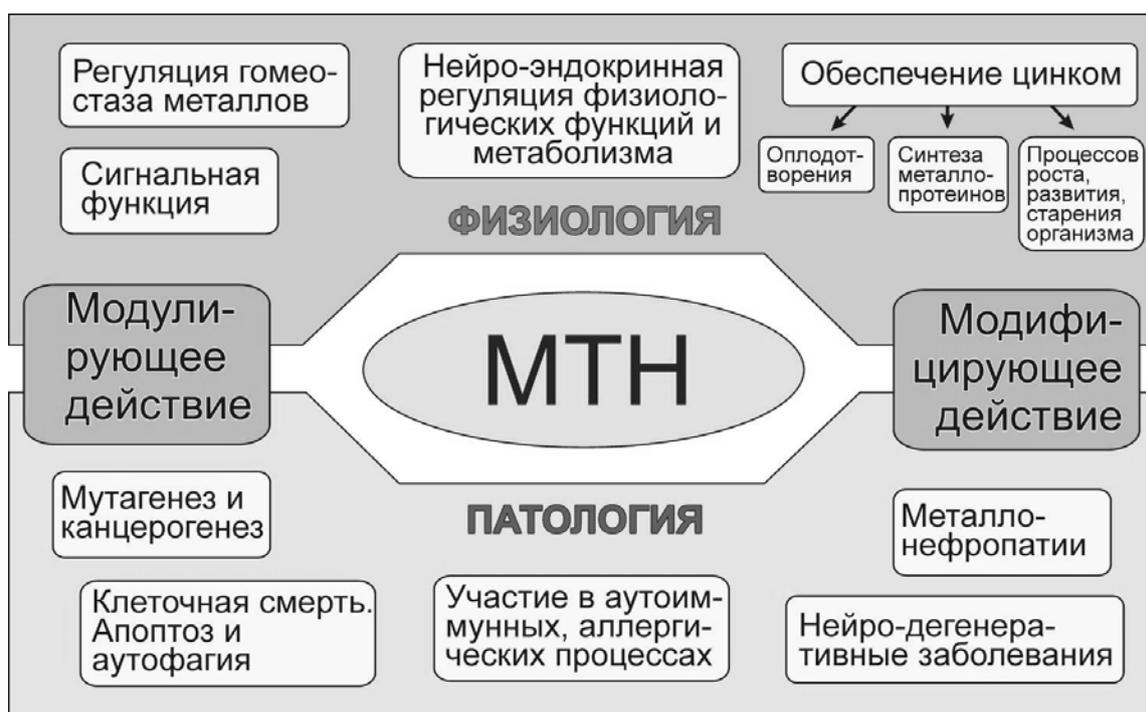


Рис. 2. Функции МТН в физиологических условиях и при патологии.

МТН осуществляет благодаря способности предоставлять биодоступный цинк участникам биохимических реакций. 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 [10].

Цинк входит в состав примерно 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.

Цинк относится к эссенциальным, необходимым для жизни микроэлементам. Он 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 взрослого человека в цинке 12–20 мг, но она значительно возрастает при ряде физиологических состояний (беременность, лактация) или протекании многих патологических процессов. Среднее содержание в крови составляет 4–6 мг/л, а физиологическая норма определена диапазоном 1–9 мг/л. 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 [11], 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), так, например, в качестве ко-фактора цинк необходим для функционирования многих дегидрогеназ (например, глутаматдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы). 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 противокислительным 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 [12]. Сегодня активно изучается сигнальная и регуляторная роль цинка в пролиферации и дифференциации клеток млекопитающих [13].

При недостатке цинка деление яйцеклетки (мейоз) прекращается на тело-

фазе 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. 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, в виде импульсов, что связано с накоплением его в цитоплазматических эндосомах и последующем экзоцитозом. Такого рода импульсы регулируются путем изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция. До момента созревания яйцеклетки высокое содержание внутриклеточного цинка приводит к блокированию входа 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-MTH, именно ему принадлежит сигнальная роль в оценке степени созревания яйцеклетки и процесса овуляции. Эта функция MTH координируется за счет его взаимодействия с интрацеллюлярным кальцием.

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 MTH транскрипционно регулируются уровнем содержания цинка в питании и гормональными стимулами, что обеспечивает, в частности, высокие концентрации MTH в печени плода с постепенным снижением в постнатальный период. Дефицит цинка в этих условиях нарушает экспрессию MTH [14].

MTH выступает как инструмент регуляции уровня цинка в клетке и транс-

локации его в ядро на этапах клеточного деления и дифференциации клеток. Именно этот взаимосвязанный с MTH механизм обеспечивает исключительную роль цинка как необходимого участника многокомпонентного процесса пролиферации и дифференциации клеток, в первую очередь для регуляции синтеза ДНК и клеточного митоза. Как справедливо указывают Beyersmann D., Haase H. [15], 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 MTF-1, NF-κB 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.

Учитывая особенно важную роль цинка для нормального протекания беременности, целью нашей работы было изучение взаимосвязи между содержанием цинка в крови и моче женщин в первом триместре беременности, которые получали (по рекомендации гинеколога) витамины с микроэлементами.

Контингенты и методы

Обследовано 35 женщин 23-35 лет в первом триместре беременности, направленные гинекологом для контроля содержания цинка и меди в крови и моче. Контрольной группой были 25 небеременных женщин той же возрастной группы. Дополнительно определяли интегральную концентрацию металлотрионенов в моче и эритроцитах. Все женщины дали согласие на участие в исследовании.

Количественный анализ цинка и меди проводили атомно-эмиссионным методом с электродуговой атомизацией на АЭС-спектрометре ЭМАС-200ССД.

Таблица 1

Процентное распределение обследуемых в зависимости от содержания цинка и меди в крови и моче

Микроэлемент	Ранг	Беременные		Небеременные	
		В крови	В моче	В крови	В моче
Zn	Ниже нормы	0,0	54,5	12,0	16,0
	В пределах нормы	88,9	27,3	80,0	72,0
	Выше нормы	11,1	18,2	8,0	12,0
Cu	Ниже нормы	25,0	83,3	32,0	92,0
	В пределах нормы	68,8		56,0	
	Выше нормы	6,3	16,7	12,0	8,0

Концентрацию металлотионеинов определяли по предложенной нами методике [16]. Для определения эритроцитарного МТН предварительно гепаринизированную кровь фракционировали на плазму и форменные элементы. Эритроциты многократно отмывали физраствором, затем проводили гемолиз в бидистиллированной воде. Определяли объем гемолизата и концентрацию белка в нем для представления данных в общепринятых единицах (нмоль/г белка). В моче дополнительно определяли креатинин.

Результаты и их обсуждение

В качестве физиологических норм содержания использовались следующие показатели: цинк — 1,16-9,0 мг/л в крови и 0,2-0,4 мг/л в моче; медь — 0,7-1,4 мг/л в крови и < 0,03 мг/л в моче.

Обследованные нами беременные в первом триместре беременности по рекомендации гинеколога принимали препараты, содержащие микроэлементы, поэтому у подавляющего большинства из них концентрации металлов в крови укладывались в норму (88,9 % по цинку и 68,8 % по меди), а у 11,1 % по цинку и 6,3 % по меди — были выше нормы. В то же время, концентрации цинка и меди в моче беременных женщин были выше нормы у значительной части обследованных (18,2 и 16,7 %, соответственно). Средняя концентрация цинка в крови у беременных, принимавших микроэлементы, была $7,99 \pm 2,3$ мг/л по сравнению с $5,21 \pm 1,6$ мг/л у небеременных женщин той же возрастной группы. Процентное

распределение обследуемых в зависимости от содержания цинка и меди в крови и моче представлено в табл. 1.

Содержание меди в биосубстратах находится главным образом в нормальных пределах, однако в 25 % случаев наблюдается пониженное содержание её в крови беременных.

Содержание МТН в эритроцитах отражает степень обеспеченности организма биодоступным цинком, потому что высокое поступление цинка в виде неорганических солей не гарантирует, к сожалению, его достаточного всасывания и транспорта к местам синтеза цинксодействующих ферментов [17, 18]. Между измеренным содержанием МТН в эритроцитах и содержанием цинка в крови обнаружена высокая корреляционная связь с коэффициентом 0,76. Среднее содержание эритроцитарного МТН у беременных составило $3,0 \pm 1,4$ нмоль/г белка, а у небеременных — $1,7 \pm 0,9$ нмоль/г белка. В то же время у 8 беременных (17,8 %) концентрация эритроцитарного МТН была выше 5 нмоль/г белка. У 6 из этих 8 и у 2-х, не попавших в эту группу, было обнаружено содержание МТН в моче в концентрациях выше 0,14 нмоль/г креатинина (1,0 мг/г креатинина), что говорит о почечной дисфункции различного генеза [19]. У 27 (60 %) человек концентрация МТН в моче была ниже предела обнаружения (< 0,1 мг/г креатинина). В контрольной группе МТН в моче был обнаружен в концентрации выше 0,14 нмоль/г креатинина (1,0 мг/г креатинина) только

у одной из 25 обследованных женщин (4 %), у 20 — концентрация МТН в моче была ниже предела обнаружения, у четырех было выявлено незначительное количество (до 0,7 мг/г креатинина). Наблюдалась положительная корреляция между концентрацией эритроцитарного МТН и МТН в моче у беременных (коэффициент корреляции 0,67), что вероятно связано с повышенной индукцией синтеза МТН при поступлении высоких концентраций цинка в связи с применением витаминно-минеральных комплексов во время беременности.

Выводы

1. Выявленная высокая положительная корреляция между содержанием МТН в эритроцитах и концентрацией цинка в крови подтвердила возможность использования их в качестве биомаркеров обеспеченности цинком при особых физиологических состояниях, например, беременности.
2. В первом триместре беременности, когда потребность матери и плода в цинке повышена, применение микроэлементных добавок оправдано и целесообразно.
3. Достаточно высокий процент беременных женщин с повышенным уровнем эритроцитарного МТН, повышенной концентрацией цинка в крови и МТН в моче показывает, что эти женщины находятся под воздействием явно завышенных ежедневных доз цинка, что может способствовать развитию почечных дисфункций. В этом случае индуктивный синтез МТН играет детоксикационную роль.
4. Прием биодобавок (особенно при беременности) должен происходить под контролем врача с обязательным измерением концентрации цинка в крови и, желательнее, эритроцитарного МТН, как маркера достаточности биодоступного цинка.

Литература

1. J. H. R. Кдги. Metallothionein: a

cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex / J. H. R. Кдгиand, B. L. Vallee // J. Biol. Chem. - 1961. - Vol. 236. – P. 2435–2442.

2. 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.
3. Edmond H. Fischer. Recent excitement regarding metallothionein. / Edmond H. Fischer and Earl W. Davie// PNAS March 31 – 1998 - vol. 95, №. 7 – P. 3333-3334
4. 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.
5. Vallee B. L. The function of metallothionein / B. L. Vallee // Neurochem. Int. - 1995. – Vol. 27, N 1. – P. 23-33.
6. Maret W. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals / W. Maret // Biometals - 2009. – Vol. 22, N 1. – P. 149-157.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Maret W. Redox biochemistry of mammalian metallothioneins. /W. Maret

- // J Biol Inorg Chem. - 2011 – № 16(7). – P. 1079-1086.
11. Скальная М. Г. О пределах физиологического (нормального) содержания Са, 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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
 16. Пыхтеева Е.Г. Сравнение методов количественного определения металлотioneина с атомно-абсорбционной и атомно-эмиссионной детекцией. / Пыхтеева Е.Г., Большой Д.В. // Здоровье и окружающая среда. Сборник научных трудов. Выпуск 17. Минск, 2011. - С. 191-194.
 17. Ann M. Coulston. Nutrition in the prevention and treatment of disease / Ann M. Coulston, Carol Boushey - London: Elsevier Academic Press, 2008 - 898 С.
 18. Zinc absorption and kinetics during pregnancy and lactation in Brazilian women / Carmen M Donangelo, Carmica L Vargas Zapata, Leslie R Woodhouse [at al] // American Journal of Clinical Nutrition – 2005 - Vol. 82, No. 1 – P. 118-124

19. 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. [at al] // Journal of Applied Toxicology - 1988 - Vol. 8, No. 1 – P. 15-21.

Резюме

РОЛЬ МЕТАЛЛОТІОНЕЇНІВ У ЗАБЕЗПЕЧЕННІ ГОМЕОСТАЗУ ЦИНКУ ПРИ ВАГІТНОСТІ

*Пихтеева О.Г., Шафран Л.М.,
Большой Д.В., Шитко О.С.*

Еритроцитарний металлотіонеїн і концентрація цинку в крові можуть бути використані як маркер забезпеченості організму біодоступним цинком, а значне їх перевищення вище фізіологічної норми може свідчити про перевантаження цим мікроелементом. Наявність металлотіонеїну в сечі є маркером ниркової дисфункції, викликаній надлишком важких металів. Проведені дослідження показують, що прийом біодобавок (особливо при вагітності) повинен відбуватися під контролем лікаря.

Ключові слова: еритроцитарний металлотіонеїн, цинк, вагітність

Summary

ROLE OF METALLOTHIONEIN IN ZINC HOMEOSTASIS DURING PREGNANCY

*Pykhtieeva E.G, Safran L.M.,
Bolshoy D. V., Shitko E.S.*

Erythrocyte metallothionein and zinc concentration in the blood can be used as a marker of bioavailable zinc supply the body, and a significant excess above their physiological limits may indicate that these trace element overload. Metallothionein in urine is a marker of renal dysfunction caused by an excess of heavy metals. Studies show that taking supplements (especially during pregnancy) should be under by medical supervision

Keywords: erythrocyte metallothionein, zinc and pregnancy

*Впервые поступила в редакцию 19.11.2011 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*