

УДК 599.332

МЕТАЛЛОТИОНЕИН: БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ 3. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТАЛЛОТИОНЕИНА И ЕГО ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Пыхтеева Е.Г.

Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса

Ключевые слова: металлотионеин, моча, медицинская диагностика

Введение

Интерес к свойствам и потенциальному применению металлотионеинов неуклонно возрастает в последние 30 лет. Для иллюстрации этого положения на рис. 1 приведена диаграмма, показывающая количество публикаций в международных реферируемых журналах по токсикологии (рис. 1), в которых «металлотионеин» указан в ключевых словах.

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], антиоксидантные свойства – в статье [3].

В последние годы, в связи с разработкой и внедрением в практику способа получения металлотионеинов методами генной инженерии, встал вопрос о возможности его практического применения в медицине, косметологии и других областях, а в связи с разработкой новых методов количественного анализа содержания металлотионеинов в биообъектах и биосредах человека, появляется большое количество

публикаций о масштабных медицинских и экологических мониторингах [4]. Многими исследователями [5], в том числе и нами, в экспериментах на животных при остром и хроническом воздействии, а также в клинических исследованиях показана потенциальная возможность использования содержания металлотионеина в крови и моче в качестве чувствительного биомаркера поражения функции печени [6, 7] и почек [8], а также одного из маркеров экзогенной или эндогенной интоксикации организма людей рядом тяжелых металлов.

Материалы и методы

Проведен литературный поиск и анализ данных, описанных в научных публикациях за последние 10 лет.

Результаты и их обсуждение Диагностическое значение МТн

По данным литературы [9], при попадании в организм ряда тяжелых металлов (например, кадмия, цинка, ртути), они первично связываются с альбумином

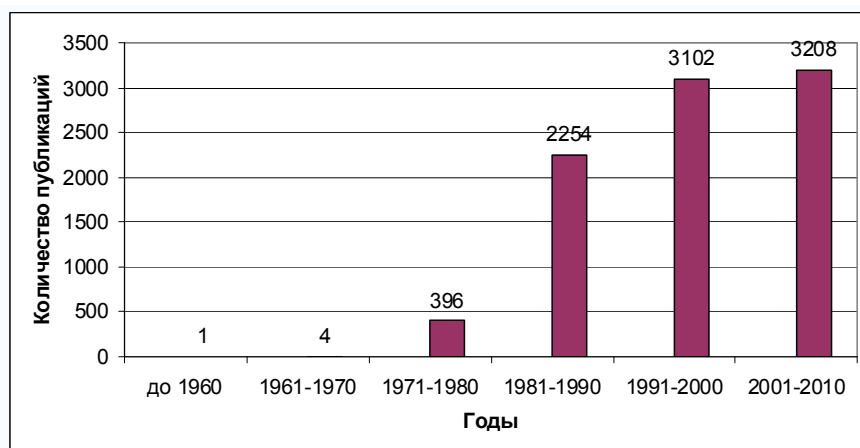


Рис. 1. Количество публикаций в реферируемых журналах по теме «металлотионеин»

и другими высокомолекулярными белками крови и транспортируются в печень, которая выступает метом синтеза МТн и перекомлексообразования металлов в высокоспецифичные и высокопрочные комплексы с ним. Комплекс металл-металлотионеин поступает в почки, где в клетках нефроэпителия происходит его деградация и выведение металлов из организма в виде низкомолекулярных соединений. Однако при металлонефропатиях при поступлении большого количества металлов в нефрон происходит его повреждение и нарушается фильтрующая функция почек, т.е. нарушается реабсорбция белков и в мочу попадают значительные количества белка. Наблюдается протеинурия. Частными случаями протеинурии являются ферментурии, металлотиионеинурии, β_2 -микроглобулинурия.

В норме металлотиионеин в моче здорового человека не определяется.

Наличие металлотиионеина в моче говорит о тубулярной дисфункции. Первые работы о применении содержания МТн в моче для оценки состояния почек были проведены в Японии в 80-х годах прошлого века и были связаны с отравлением кадмием (болезнь Итай-итай) [10]. В это же время в экспериментах на животных было показано, что заметные концентрации МТн в моче наблюдаются при концентрации кадмия в печени 200 мкг/г и почках 300 мкг/г, т.е. при достаточно высоких поступивших дозах кадмия [11].

Пятикратное подкожное введение 5 мкмоль/кг·день CdCl_2 , HgCl_2 , CuSO_4 или ZnCl_2 белым крысам вызывало рост содержания меди и цинка в печени не только при введении этих металлов, но и при введении CdCl_2 , HgCl_2 , что может объясняться индуктивным синтезом МТн. Интересно, что введение $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ не изменяет содержания меди и цинка в печени.

Уровень МТн в моче контрольных крыс определяется на уровне $0,85 \pm 0,17$ мг/г креатинина. После 5 введения HgCl_2

наблюдался 25 кратный, CdCl_2 — в 9-кратный, CuSO_4 — 2 ZnCl_2 — 3-кратный рост концентрации МТн в моче [12]. Металлотиионеин определяется в моче крыс на 4 день после экспозиции [13]

Важную роль играет взаимодействие тяжелых и эссенциальных металлов, что проявляется, например, в увеличении в 3-4 раза экскреции магния и кальция с мочой при двукратном интаперитонеальном введении крысам 0,5-1,0 мг/кг хлорида ртути [14]. Максимум экскреции наблюдается через 8-12 и 32-36 часов после первого введения. Пик металлотиионеинурии наблюдается через 36 часов после максимального пика выведения ртути с мочой.

Опубликованы данные о возможности определения МТн-урии в мониторинговых исследованиях контингентов, у которых подозревается повышенный контакт с ТМ [15] радиоизотопным методом. В другом исследовании измерения проводились методом ELISA (иммуферментный анализ) [16]. Авторы показали, что уровень МТн в моче в группе детей, проживающей на территории, загрязненной двухвалентными металлами, был достоверно выше, чем у контрольной группы из «благоприятных» условий проживания. Метод ELISA рекомендован авторами как наиболее чувствительный и быстрый метод физико-химического определения концентрации МТн в моче, который позволяет проводить массовые исследования.

У женщин с повышенной экскрецией МТн с мочой наблюдается положительная корреляция между логарифмом концентрации металлотиионеина в моче и логарифмом концентрации в моче меди, общего белка, α_1 -макроглобулина, β_2 -макроглобулина, мочевой кислоты и фосфатов. Это значит, что уровень МТн в моче может выступать индикатором почечной дисфункции, вызванной экспозицией кадмием [17].

При профессиональной экспозиции достаточно высокими дозами тяжелых

металлов мониторинг содержания МТн в моче может быть эффективным способом раннего выявления почечной дисфункции [18] 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 более современном исследовании [19, 20] для целей ранней диагностики металлопатий исследована 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. Т.е. 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 [21]. Это особенно важно для профессионального отбора в условиях страховой медицины, чтобы минимизировать вредное воздействие производственной среды.

В настоящее время исследование содержания МТн в моче людей, подвергшихся воздействию ТМ (кадмия, ртути, меди, цинка и др.) является широко распространенной процедурой [22, 23, 24].

Практическое применение металлотioneина

Особенности первичной и вторичной структуры молекулы МТн обуславливают его способность прочно связывать двухвалентные металлы, многие из которых весьма токсичны (кадмий, ртуть). МТн является одним из участников регуляции гомеостаза меди и цинка и

соотношения медь-цинк в тканях организма, что очень важно для их нормального функционирования. Кроме этого, высокое содержание свободных SH-групп в молекуле металлотioneина придает ему способность эффективно обезвреживать свободные радикалы, т.е. противостоять стрессорному воздействию окружающей среды и вредных привычек (например, курению).

В рекламных проспектах крупных косметических фирм, использующих инновационные технологии (например, L'Oreal, Faberlic, Mary Kay и др.) написано, что МТн помогает восстановить и продлить естественную молодость любого организма, а кремы и маски на его основе хорошо защищают кожу от вредного воздействия окружающей среды

Кроме того встречаются рекламные статьи о возможности применения МТн в виде пищевых добавок. Считается, что он помогает восстановить и продлить естественную молодость любого организма за счет мощного антиоксидантного эффекта, и даже позволяет отодвинуть наступление менопаузы у женщин.

На наш взгляд, к таким заявлениям следует относиться с достаточной долей осторожности, т.к. существует множество серьезных работ, подтверждающих, что комплекс кадмий-МТн или ртуть-МТн обладает гораздо большей нефротоксичностью при введении в организм, чем сами ртуть и кадмий в эквивалентных концентрациях [5, 25]

Кроме того, как всякий другой белок, металлотioneин подлежит деградации в желудочно-кишечном тракте с разрушением его структуры, поэтому введение его в пищевые добавки, по нашему мнению, нецелесообразно.

Выводы

Анализ литературы по диагностическому применению МТн позволяет утверждать:

1. Повышенное содержание МТн в крови не дает возможности диагностировать отравление или микроэле-

- ментоз (поскольку индукция синтеза МТн кроме ТМ вызывается еще рядом стрессорных воздействий) без знания концентрации металлов в биосредах, но является достаточно информативным дополнительным тестом.
2. Наличие МТн в моче людей в достаточно высоких концентрациях (выше 0,5 мг/г креатинина) свидетельствует о наличии ренальной дисфункции, наряду с содержанием b_2 -микроглобулина, и может быть использовано для ранней диагностики металло-нефропатий.
 3. Уровень МТн в моче людей (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.
 4. Вопросы практического применения МТн, синтезированного методами генной инженерии, активно обсуждаются, но пока не имеют под собой серьезной научной платформы. Эти аспекты нуждаются в дополнительных исследованиях.
- 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. Пыхтеева Е.Г. Металлотионеин: биологические функции. Антиоксидантные функции металлотионеина - Ж. Актуальные проблемы транспортной медицины - №1- С.111-116.- 2010 г.
 4. Okazaki Y., Namikawa K., Minami T. Studies of metals and metallothionein in tissue. - *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 2000, Mar; 120(3): 282-289
 5. Liu Y., Liu J., Habeebu S.M., Waalkes M.P., Klaassen C.D. Metallothionein-I/II null mice are sensitive to chronic oral cadmium-induced nephrotoxicity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 2000, Sep; 57(1):167-76
 6. Brewer G.J., Johnson V.D., Dick R.D., Hedera P., Fink J.K., Kluin K.J., Treatment of Wilson's disease with zinc. XVII: treatment during pregnancy. - *Hepatology*. 2000, Feb; 31(2):364-70.
 7. Brewer G.J., Zinc acetate for the treatment of Wilson's disease.- *Expert opinion on pharmacotherapy*.- 2001, Sep; 2(9):1473-7.
 8. Abe T., Kobayashi E., Okubo Y., Suwazono Y., Kido T., Shaikh Z.A. Nogawa K. Application of path analysis to urinary findings of cadmium-induced renal dysfunction.- *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering* - 2001; 36(1):75-87.V:
 9. Трахтенберг И.М., Шафран Л.М. Тиоловые яды. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова.- М.: Медицина, 2002. – 608 с. Гл. 4. Тиоловые яды. – С. 111-175.
 10. Urinary metallothionein as a new index of renal dysfunction in «Itai-Itai» disease patients and other Japanese women environmentally exposed to cadmium. Tohyama C., Shaikh ZA, Nogawa K, Kobayashi E, Honda R. *Arch Toxicol*. 1982, Jul; 50(2):159-66. [Archives of toxicology]
 11. Metallothionein excretion in urine upon cadmium exposure: its relationship with liver and kidney cadmium. Tohyama C., Shaikh Z.A., Ellis K.J., Cohn S.H. *Toxicology*. 1981; 22(3):181-91.

- [Toxicology]
12. Urinary metallothionein and tissue metal levels of rats injected with cadmium, mercury, lead, copper or zinc. Lee Y.H., Shaikh Z.A., Tohyama C. *Toxicology*. 1983 Jul-Aug; 27(3-4):337-45. [Toxicology]
 13. Tohyama C, Shaikh ZA. Metallothionein in plasma and urine of cadmium-exposed rats determined by a single-antibody radioimmunoassay. - *Fundam Appl Toxicol*. 1981 Jan-Feb; 1(1):1-7. [Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology]
 14. Increased urinary calcium and magnesium excretion in rats injected with mercuric chloride. Liu X.Y., Jin T.Y., Nordberg G.F. *Pharmacol Toxicol*. 1991, Apr; 68(4):254-9. [Pharmacology & toxicology]
 15. Biological monitoring for occupational cadmium exposure: the urinary metallothionein. Shaikh Z.A., Ellis K.J., Subramanian K.S., Greenberg A. *Toxicology*. 1990, Jul; 63(1):53-62. [Toxicology]
 16. Enzyme-immunoassay for the determination of metallothionein in human urine: application to environmental monitoring. Swierczek S., Abuknesha R.A., Chivers I., Baranovska I., Cunningham P., Price R.G. - *Biomarkers*. 2004 Jul-Oct; 9(4-5):331-40. [Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals]
 17. 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., Sugihira N., Nakano A., Saito H. *Journal of Applied Toxicology*, Vol. 8, No. 1, pages 15-21, 20 references, 1988
 18. Nakajima M Kobayashi E Suwazono Y Uetani M Oishi M Inaba T Kido T Shaikh ZA Nogawa K. Excretion of urinary cadmium, copper, and zinc in cadmium-exposed and nonexposed subjects, with special reference to urinary excretion of beta2-microglobulin and metallothionein. - *Biol Trace Elem Res*. 2005 (Winter); 108(1-3):17-31. [Biological trace element research]
 19. Lu J., Jin T., Nordberg G., Nordberg M. Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes from cadmium-exposed workers. *Cell Stress Chaperones*. 2001, Apr; 6(2):97-104. [Cell stress & chaperones]
 20. Chang X., Jin T., Chen L., Nordberg M., Lei L., Metallothionein I isoform mRNA expression in peripheral lymphocytes as a biomarker for occupational cadmium exposure. - *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009, Jun; 234(6):666-72. [Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)]
 21. Gundacker C., Komarnicki G., Jagiello P., Gencikova A., Dahmen N., Wittmann K.J., Gencik M. Glutathione-S-transferase polymorphism, metallothionein expression, and mercury levels among students in Austria- *Sci Total Environ*. 2007, Oct 15; 385(1-3):37-47. [The Science of the total environment]
 22. Nordberg GF. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China- *Toxicol Lett*. 2010, Jan 15; 192(1):45-9. [Toxicology letters]
 23. Nordberg G.F., Jin T., Wu X., Lu J., Chen L., Lei L., Hong F., Nordberg M. -Prevalence of kidney dysfunction in humans - relationship to cadmium dose, metallothionein, immunological and metabolic factors. - *Biochimie*. 2009, Oct; 91(10):1282-5. [Biochimie]
 24. Prozialeck W.C., Edwards J.R., Vaidya V.S., Bonventre J.V. Preclinical evaluation of novel urinary biomarkers of cadmium nephrotoxicity. - *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009, Aug 1; 238(3):301-5. [Toxicology and applied

pharmacology]

25. Liu J., Liu Y., Klaassen C.D.// Nephrotoxicity of CdCl₂ and Cd-Metallothionein in Cultured Rat Kidney Proximal Tubules and LLC-PK1 Cells – Toxicology and Applied Pharmacology – V. 128, №. 2 – P. 264-270 – 1994.

Резюме

**МЕТАЛЛОТІОНЕЇН: БІОЛОГІЧНІ ФУНКЦІЇ
3. ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ
МЕТАЛЛОТІОНЕЇНУ І ЙОГО
ДІАГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ**

Пихтєєва О.Г.

Аналіз літератури по діагностичному застосуванню металлотіонеїну (MTn) дозволяє стверджувати, що підвищений вміст MTn в крові не дає можливості діагностувати отруєння або мікроелементоз (оскільки індукція синтезу MTn окрім важких металів викликається багатьма стресорними діями) без знання концентрації металів в біосередовищах, але є достатньо інформативним додатковим тестом. Наявність MTn в сечі людей в достатньо високих концентраціях (вище 0,5 міліграм/г креатиніну) свідчить про наявність ренальної дисфункції, разом із змістом b2-мікроглобуліну, і може бути використана для ранньої діагностики металонефропатій. Рівень MTn в сечі людей (при концентрації вище 1 мг/г креатиніну) корелює з рівнем кадмію в крові і сечі, а також з рівнем кадмію в печінці і нирках, визначеному *in vivo* нейтронно-активаційним методом.

Питання практичного застосування MTn, синтезованого методами генної інженерії, активно обговорюються, але поки не мають під собою серйозної наукової платформи. Ці аспекти потребують додаткових досліджень.

Ключові слова: металлотіонеїн, сеча, медична діагностика

Summary

**METALLOTIONEIN: BIOLOGICAL
FUNCTIONS 3. PRACTICAL APPLICATION
OF METALLOTIONEIN AND HIS
DIAGNOSTIC VALUE**

Pykhtyeyeva E.G.

Literature is analysed on application of MTn for medical diagnostics. It is rotined that MTn in blood does not enable to diagnose poisoning without knowledge of metals concentration in blood, urine and hairs, but is an informing enough additional test. The high concentrations of MTn in urine (higher 0,5 mgs/g of creatinine) testifies to the presence of renal disfunction, along with maintenance of b2-microglobulin, and it can be utilized for early diagnostics of metallic nephropathy. The level of MTn in urine of people (concentration higher of a 1 mg/g of creatinine) correlates with the level of cadmium in blood and urine, and also with the level of cadmium in a liver and kidney, measured *in vivo* by a neutron-activating method.

The problems of practical application of MTn, synthesized by methods of the gene engineering, come into a question actively, but while does not have under itself a serious scientific platform. These aspects need additional researches.

Keywords: metallothionein, urine, medical diagnostics

*Впервые поступила в редакцию 15.05.2010 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*