

Н. В. Безручко, Г. К. Рубцов, О. М. Григорьева

МЕТАЛЛОТИОНЕИНЫ: ВЗАИМОСВЯЗЬ С ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИЕЙ БЕЛКОВ И ЛИПИДОВ, МЕТОДЫ МОНИТОРИНГА

На основе литературных данных рассматривается широкий спектр биологических функций металлотионеинов, в том числе транспорт металлов в организме, защита от окислительного стресса, а также их применение как диагностического теста при интоксикациях, в том числе при отравлениях тяжелыми металлами. Методологически обосновываются возможные взаимосвязи обмена металлотионеинов с окислительной модификацией белков и липидов (спонтанной и металлинизируемой). Предлагается применение методов мониторинга соответствующих тестов в системе с определением уровня молекул средней массы как параметров интоксикации, в том числе при воздействии тяжелых металлов, для выявления корреляций динамики металлотионеинов в организме в условиях окислительного стресса.

Ключевые слова: металлотионеины, окислительная модификация белков и липидов, мониторинг.

Металлотионеины (МТ) – семейство белков, процессы индукции и деградации которых тесно взаимосвязаны с функционированием центральной нервной системы в норме и при патологии [1–3]. Установлено, что четыре основные изоформы металлотионеинов выполняют разные биологические роли, локализуются в различных тканях. Индукция МТ является универсальной реакцией на воздействие разнообразных стрессорных факторов [4–7].

В течение последних лет представления о роли МТ в поддержании гомеостаза металлов в тканях в норме и при патологии претерпели существенные изменения. Отмечается полифункциональность металлотионеинов (транспорт ионов металлов, поддержание окислительно-восстановительных реакций, протекторная, сигнальная, модулирующая и регулирующие функции) и их влияние на такие базовые клеточные функции, как пролиферация, дифференцировка, запрограммированная клеточная гибель. Кроме того, показана особая роль МТ в патогенезе сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и опухолевых заболеваний. В настоящее время эти молекулы все чаще рассматриваются в качестве потенциальных мишеней для терапии широкого спектра заболеваний, а разработка подходов к направленной регуляции экспрессии МТ – одно из перспективных направлений фармакологии и токсикологии. Считается безопасным применение металлотионеинов в качестве терапевтических средств [8].

Металлотионеины представляют собой низкомолекулярные белки, содержащие до 30 % цистеина и способные связывать ионы тяжелых металлов. Синтез МТ индуцируется под влиянием различных химических и физических факторов. Функции МТ до конца не выяснены, хотя доказана их роль в снижении токсичности тяжелых металлов и в регуляции уровней цинка и меди в организме. Весьма вероятно также участие этих белков в защите биологических объектов от окислительного стресса. Стрессорный характер синтеза МТ, их способность

к детоксификации некоторых соединений, наличие большого количества тиоловых групп делают изучение этих белков актуальным в радиобиологическом аспекте. Так, обнаружено, что индукция синтеза эндогенных МТ приводит к увеличению радиорезистентности различных биологических объектов *in vitro* и *in vivo* [9].

Цель работы – методологическое обоснование системы методов мониторинга металлотионеинов для выявления взаимосвязей с окислительной модификацией белков и липидов (спонтанной и металлинизируемой).

Биологическая роль металлотионеинов в процессах свободно-радикального окисления биомолекул и связывании тяжелых металлов

Металлотионеинам принадлежит ключевая роль в абсорбции и гомеостазе необходимых металлов (Zn, Си) и в детоксикации тяжелых металлов (Cd, Hg и др.). Благодаря наличию свободных SH-групп МТ защищают клетки от свободнорадикальных процессов; окисление этих групп приводит к высвобождению ионов металлов и олигомеризации белка. Синтез МТ легко индуцируется различными металлами и другими факторами, включая бактериальные эндотоксины, алкилирующие соединения, интерфероны, цитокины, ряд гормонов, ионизирующее и ультрафиолетовое излучение. Многие физические, химические и эндогенные факторы, генерирующие продукцию реакционных кислородных радикалов, таких как супероксидный и гидроксильный радикалы, также являются индукторами синтеза МТ и других белков с антиоксидантными свойствами, в том числе церулоплазмина. Известна МТгенная активность ряда органических соединений, в том числе гербицидов и пестицидов, и лекарственных средств: индометацина, противоопухолевых препаратов (включая доксорубин и блеомицин), арбидола и др. [10].

Металлотионеины – семейство индуцибельных цитоплазматических белков (6,5 кД), состоящих из

61 аминокислоты, из которых 20 цистеинов расположены в строго определенном положении, что обеспечивает уникальную способность связывать ионы металлов. Методами иммуногистохимии в различных органах и опухолях идентифицированы клетки, содержащие МТ. Получены и охарактеризованы высокоспецифичные поликлональные кроличьи антитела к металлотионеинам. Использование нормальной и опухолевой ткани молочной железы в качестве известных моделей иммуноокрашивания металлотионеинов позволило показать пригодность полученных антител для иммуногистохимического определения металлотионеинов на гистологических срезах. Показано, что МТ участвуют в депонировании и метаболизме необходимых (Zn, Cu, Mn и др.) и элиминации токсичных тяжелых металлов (Cd, Pb, Hg и др.). Известна антиоксидантная активность МТ и их способность защищать клетки и организм млекопитающих от последствий ионизирующих и ультрафиолетовых излучений, химических агентов и других факторов, действующих как генераторы свободных радикалов. Показана возможность применения кроличьих поликлональных антител к МТ для иммунолокализации МТ на гистологических срезах [11].

Значение металлотионеинов для радиационной биологии

Исследовано действие импульсного нейтронного излучения в сравнении с длительным нейтронным и гамма-излучениями на выживаемость мышей и содержание МТ в их печени и почках. Критериями оценки радиобиологических эффектов служили выживаемость животных и индукция синтеза МТ в печени и почках мышей, облученных в равноэквивалентных дозах. Показано снижение уровня МТ в печени и почках облученных нейтронами мышей через 24 ч, что является свидетельством более интенсивных свободнорадикальных процессов, инициируемых импульсным нейтронным излучением. В то же время не отмечено различий в относительной биологической эффективности между импульсным и непрерывными режимами нейтронного облучения по критерию выживаемости животных. Разработка реакторов нейтронного излучения нового поколения, функционирующих в импульсном режиме, открывает широкую перспективу для радиобиологических исследований нейтронного воздействия при значениях мощности дозы выше 100 Гр/мин. К настоящему времени известно, что эффект длительного облучения быстрыми реакторными нейтронами незначительно снижается с увеличением мощности дозы и при значениях 0,2–0,5 Гр/мин наступает порог, выше которого эффект излучения от нее практически не зависит. Тем не менее при очень высокой интенсивности и, как правило, при воздействиях в ле-

тальных и сверхлетальных дозах наблюдается существенное снижение гибели и рост продолжительности жизни лабораторных животных, которые авторы связывают в том числе и с выгоранием кислорода. По другим данным, даже при высоких дозах не было замечено влияния мощности дозы на эффективность воздействия [12].

В опытах на мышах-самцах (СВА х С57В1/6)F1, подвергнутых общему однократному облучению в дозе 7 Гр и затем термическому ожогу 10 % поверхности тела, установлено, что предварительное (за 48 и 24 ч до комбинированного радиационно-термического поражения (КРТП)) подкожное введение животным известного индуктора биосинтеза металлотионеинов (МТ) – хлористого кадмия в дозе 1 мг/кг вызывает 20-кратное повышение концентрации МТ в печени. Развитие КРТП приводит к дальнейшему увеличению внутривисцерального содержания МТ. Повышение количества МТ в печени не сопровождается одновременным увеличением содержания МТ в клетках костного мозга и не обеспечивает защиту от гематотоксических и летальных эффектов КРТП [13].

Через 24 ч после острого воздействия гамма-излучения в дозах 0,01; 0,5 и 1 Гр *in vitro* на нестимулированные лимфоциты крыс уровень содержания МТ в них не изменяется, в то время как при облучении в дозах 1,75 и 2,5 Гр увеличивается в среднем в 2 и 2,6 раза. При адаптирующем воздействии радиации в дозе 0,01 Гр за 2 ч до облучения в повреждающей дозе 1,75 Гр отмечается достоверно меньшее (в среднем в 1,5 раза) повышение содержания МТ. Обнаружена гетерогенность в проявлении радиоадаптивного ответа по МТ-тесту для различных препаратов лимфоцитов. Обсуждаются два возможных механизма обнаруженных изменений, один из которых связан с селекционной гибелью после облучения клеток с исходно низким уровнем МТ, а другой обусловлен пострадиационным синтезом МТ в результате накопления повреждений ДНК и амплификации МТ-генов [14].

Показана перспективность использования металлотионеина в качестве хелатирующего агента для разработки радиофармпрепаратов на основе ^{213}Bi . Разработка новых радиофармпрепаратов (РФП) для радиотерапии онкологических и неонкологических заболеваний является важным направлением ядерной медицины. Выбор радионуклидов с оптимальными ядерно-физическими характеристиками и носителей для селективной доставки радионуклидов к очагу опухолевого или неопухолевого поражения является основой для создания эффективных и безопасных РФП. Разработаны наборы к генератору $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ с оптимальным составом реагентов на основе иммуноглобулинов и фосфоорганических комплексо-

нов. Прямое введение радионуклидов в молекулу иммуноглобулинов снижает их специфичность. Чтобы минимизировать снижение активности и специфичности иммуноглобулинов, разработана методика его модификации путем присоединения к иммуноглобулинам низкомолекулярного индуцибельного цитоплазматического белка – металлотионеина. Металлотионеин способен присоединяться с высокой константой связывания одновременно 7 ионов тяжелых металлов [15].

Влияние металлотионеинов на выраженность токсического действия тяжелых металлов на организм

Применение дигидрокверцетина и аскорбиновой кислоты у крыс, подвергнутых хроническому воздействию кадмия, способствует снижению токсического действия металла на организм за счет ингибирования интенсивности свободнорадикального перекисного окисления липидов и индукции синтеза металлотионеинов. У экспериментальных животных отмечено снижение концентрации кадмия в печени и почках, что свидетельствует об усилении его экскреции из организма [16].

Обнаружены существенные различия в содержании металлотионеина (МТ) и кадмия в печени и почках крыс разного возраста при внутрибрюшинном введении раствора нитрата кадмия в дозах 0,5 и 2 мг/кг по иону металла. У 60-недельных животных отмечали более низкий уровень МТ в органах, чем у 40-недельных, а содержание кадмия было выше. С возрастанием дозы воздействия эти различия усугублялись. Предполагается, что воздействие металла в больших дозах выявляет эффект ослабления компенсаторно-защитных возможностей организма с увеличением возраста [17].

В лимфоцитах периферической крови овец, которые с рационом получали нитрат свинца в концентрациях 5; 25 и 150 мг/кг корма, определяли содержание общего белка и металлотионеинов. Образцы крови отбирали из яремной вены овец до кормления на 7, 14, 28, 42, 70 и 90-е сутки исследования. Хроническое поступление свинца с рационом в организм овец характеризуется увеличением уровня металлотионеинов в лимфоцитах периферической крови при одновременном снижении их жизнеспособности. В то же время количество общего белка в начальные сроки интоксикации повышается, а в последующие – снижается. Определение содержания металлотионеинов в лимфоцитах периферической крови предлагается использовать как информативный показатель при оценке воздействия свинца на млекопитающих [18].

Иммунохимические методы мониторинга металлотионеинов

Изучены иммуногистохимические особенности экспрессии металлотионеина в органах крысы при

острой интоксикации цинком и свинцом. Иммуногистохимическим методом в различных органах и тканях крыс исследовалась экспрессия металлотионеина после введения соединений свинца и цинка. Применялись антитела LifeSpan Biosciences, Inc., реагенты для визуализации – на основе полимера Novolink и пероксидазы (RE7290-K). Экспрессия металлотионеина носила избирательный характер разной интенсивности. Введение свинца вызвало более выраженные морфологические изменения в органах по сравнению с таковыми при введении цинка. Описанный протокол исследования может быть эффективно использован при судебно-медицинском исследовании органов в случаях острого отравления соединениями тяжелых металлов. Отмечена целесообразность дальнейших исследований в разработке эффективного протокола по выявлению и использованию металлотионеина как биомаркера отравлений тяжелыми металлами [19].

Существует достаточно большое количество методов определения металлотионеинов в биосубстратах человека и животных. Один из получивших применение на практике – метод Л. М. Шафран и соавт., достаточно дешевый и доступный практически любой лаборатории, оснащенной для анализа биосубстратов на тяжелые металлы, при условии наличия квалифицированного химика-аналитика [20].

Проведен сравнительный анализ концентрации металлотионеинов в плазме крови людей при использовании двух разных методов определения. Концентрация металлотионеинов у пациентов первой группы, кровь которых содержала цинк, медь, свинец, кадмий и марганец в пределах референтных значений, а ртуть в следовых количествах, определена как $(14,0 \pm 0,9)$ нг/мл с использованием метода связывания кадмия *in vitro*, а с помощью иммуноферментного анализа у этих же больных регистрировали $(10,4 \pm 1,1)$ нг/мл. Уровень металлотионеинов в крови пациентов с повышенной концентрацией марганца и ртути достоверно выше, чем в первой группе при обоих методах определения. Полученные данные могут служить основой дальнейшего мониторинга металлотионеинов в крови людей как одного из биомаркеров воздействия тяжелых металлов [21].

Заключение

Биологические функции металлотионеинов весьма многообразны: велика их роль в транспорте металлов в организме [22], в защите от оксидативного стресса [23], а также как диагностического теста при интоксикациях [24–26], в том числе при отравлениях тяжелыми металлами [27], чему могут служить подтверждением исследования ряда зарубежных авторов [28–33].

Специфические металлотранспортные белки – металлотионеины – играют решающую роль в накоплении, перераспределении и выведении кадмия и ртути. Введение солей этих металлов вызывает индуктивный синтез металлотионеинов в печени [34].

Учитывая вышеизложенное, можно предположить наличие возможных взаимосвязей обмена металлотионеинов с окислительной модификацией белков и липидов (спонтанной и металл-иницируемой).

С. В. Низкодубова и соавт. [35], проведя глубокие исследования физико-химических свойств природного биологического сырья, показали наличие органических биологически активных соединений в их липидорастворимой фракции. В связи с этим исследование метаболических превращений,

в том числе окислительной модификации, липидов и белков необходимо проводить в комплексе.

При этом представляется методологически обоснованным применение методов мониторинга соответствующих тестов в системе с определением уровня молекул средней массы как параметров интоксикации [36], в том числе при воздействии тяжелых металлов. Ранее нами был разработан способ определения окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы, подтвержденный патентом на изобретение Российской Федерации [37]. Он может быть использован, в комплексе с методами определения окислительной модификации липидов для выявления корреляций динамики металлотионеинов в организме в условиях окислительного стресса при развивающейся интоксикации.

Список литературы

1. Ghoshal K., Majumder S., Li Z., Dong X., Jacob S. T. Suppression of metallothionein gene expression in a rat hepatoma because of promoter-specific DNA methylation // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275 (1). P. 539–547.
2. Roel M., Rubiolo J. A., Terson E., Thomas O. P., Vieytes M. R., Botana L. M. Crambescin C1 Exerts a Cytoprotective Effect on HepG2 Cells through Metallothionein Induction // *Mar Drugs.* 2015. V. 13 (8). P. 4633–4653.
3. Zhang X., Sha M. L., Yao Y. T., Da J., Ni X. S. Effect of heat shock pretreatment on apoptosis and metallothionein expression in rat cardiomyocytes // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. V. 8 (5). P. 7667–7672.
4. Елаева Н. Л., Минаева Л. В., Батоцыренова Е. Г., Степанова С. В., Елаева М. Н., Кашуро В. А. К вопросу о роли металлотионеинов как маркеров тренированности к физической нагрузке // *Успехи современного естествознания.* 2015. № 3. С. 133–136.
5. Biswal M. R., Ahmed C. M., Ildefonso C. J., Han P., Li H., Jivanji H., Mao H., Lewin A. S. Systemic treatment with a 5HT1a agonist induces antioxidant protection and preserves the retina from mitochondrial oxidative stress // *Exp. Eye Res.* 2015. V. 140. P. 94–105.
6. Fabisiak J. P., Borisenko G. G., Liu S. X., Tyurin V. A., Pitt B. R., Kagan V. E. Redox sensor function of metallothioneins // *Methods Enzymol.* 2002. V. 353. P. 268–281.
7. Yang M., Zhang F., Wang F., Dong Z., Cao Q., Chen M. Characterization of a Type 1 Metallothionein Gene from the Stresses-Tolerant Plant *Ziziphus jujuba* // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. V. 16(8). P. 16750–16762.
8. Кутяков В. А., Салмина А. Б. Металлотионеины как сенсоры и регуляторы обмена металлов в клетках // *Бюллетень сибирской медицины.* 2014. Т. 13, № 3. С. 91–99.
9. Никольский А. В., Пушкарева Н. Б., Требенков З. А., Котеров А. Н. Возможный механизм противолучевого эффекта металлотионеина: стимуляция репликативного синтеза ДНК и пролиферации клеток костного мозга // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 1998. № 3. С. 432–437.
10. Сморицанова О. А., Ротт Г. М., Савина Е. П., Трофимов Ф. А., Скворцов В. Г., Деева В. С., Шевченко Л. И. Синтез и металлотионеиновая активность некоторых производных бензофурана // *Химико-фармацевтический журнал.* 1998. № 12. С. 28–30.
11. Ротт Г. М., Южаков В. В., Новикова И. С., Неборак Ю. Т. Поликлональные антитела к металлотионеинам: получение, специфичность и иммуноокрашивание на гистологических срезах // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1998. № 6. С. 709–712.
12. Сморицанова О. А., Кузнецова М. Н., Ротт Г. М., Ульяненко С. Е. Выживаемость мышей и содержание металлотионеинов в их печени и почках как критерии оценки воздействия импульсного нейтронного излучения // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2000. № 4. С. 387–391.
13. Сморицанова О. А., Будагов Р. С., Ротт Г. М., Ульянова Л. П. Повышение содержания металлотионеинов в печени мышей после введения хлористого кадмия не защищает от комбинированных радиационно-термических повреждений // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2001. № 6. С. 671–676.
14. Котеров А. Н., Филиппович И. В. Радиоадаптивный ответ *in vitro* нестимулированных лимфоцитов крыс по металлотионеиновому тесту // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2002. № 2. С. 130–135.
15. Сморицанова О. А., Новикова И. С., Скворцов В. Г., Подгородниченко В. К., Петриев В. М. Перспективы использования металлотионеина в качестве хелатирующего агента для разработки радиофармпрепаратов на основе ²¹³Bi // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2010. № 1. С. 44–49.
16. Фролова Н. А., Мирзоев Э. Б., Кобялко В. О., Губина О. А., Мельник А. Д. Влияние дигидрохверцитина и аскорбиновой кислоты на содержание малонового диальдегида и металлотионеинов в органах крыс, подвергнутых хроническому воздействию кадмия // *Токсикологический вестник.* 2009. № 4. С. 16–19.

17. Кобялко В. О., Мирзоев Э. Б., Губина О. А., Фролова Н. А., Ратникова Л. И., Анисимов В. С. Содержание металлотионеинов в печени и почках крыс разного возраста при внутрибрюшинном введении нитрата кадмия // Токсикологический вестник. 2011. № 5. С. 18–21.
18. Мирзоев Э. Б., Кобялко В. О., Полякова И. В., Губина О. А., Фролова Н. А. Содержание металлотионеинов и общего белка в лимфоцитах периферической крови овец при хроническом поступлении нитрата свинца с рационом // Токсикологический вестник. 2014. № 6. С. 36–39.
19. Кутяков В. А., Шестакова Л. А., Салмина А. Б., Чикун В. И. Особенности экспрессии металлотионеина в органах крысы при интоксикации цинком и свинцом // Сибирское медицинское обозрение. 2014. № 2. С. 29–33.
20. Шафран Л. М., Пыхтеев Д. М., Большой Д. В. Металлотионеин как биомаркер в эксперименте и клинике // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2011. № 9. С. 60–64.
21. Елаева Н. Л., Иваненко А. А., Беликова В. Д., Кашуро В. А., Малов А. М., Соколян Н. А. Сравнительный анализ концентрации металлотионеинов в плазме крови людей при использовании двух разных методов определения // Токсикологический вестник. 2013. № 4. С. 22–25.
22. Пыхтеева Е. Г. Металлотионеин: биологические функции. Роль металлотионеина в транспорте металлов в организме // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2009. № 4 (18). С. 44–58.
23. Пыхтеева Е. Г. Металлотионеин: биологические функции 2. Роль металлотионеина в защите от оксидативного стресса // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2010. № 1 (19). С. 114–120.
24. Пыхтеева Е. Г., Большой Д. В., Самохина Н. А., Стужук Е. С., Третьяков А. М. Влияние предварительной индукции металлотионеина на устойчивость АОС организма белых крыс при воздействии токсичных продуктов горения ПВХ // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2010. № 3 (21). С. 112–117.
25. Пыхтеева Е. Г., Потапов Е. А., Большой Д. В., Пыхтеева Е. Д. In vitro моделирование действия кадмия на эпителиальные клетки при предварительной индукции металлотионеина in vivo // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2011. № 2 (24). С. 88–93.
26. Пыхтеев Д. М., Пыхтеева Е. Г., Большой Д. В., Самойленко Т. В., Яременко Е. Н. Исследование экспрессии генов металлотионеина в клеточной культуре фибробластов печени крыс и ее роли в выживаемости клеток при экспозиции тяжелыми металлами // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2013. № 3 (33). С. 119–129.
27. Пыхтеева Е. Г. Металлотионеин: биологические функции 3. Практическое применение металлотионеина и его диагностическое значение // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2010. № 2 (20). С. 58–63.
28. Göbel H., van der Wal A. C., Teeling P., van der Loos C. M., Becker A. E. Metallothionein in human atherosclerotic lesions: a scavenger mechanism for reactive oxygen species in the plaque? // Virchows Arch. 2000. V. 437(5). P. 528–533.
29. Greisen P., Jespersen J. B., Kepp K. P. Metallothionein Zn²⁺- and Cu²⁺-clusters from first-principles calculations // Dalton Trans. 2012. V. 41 (8). P. 2247–2256.
30. Juárez-Rebollar D., Manjarrez J., Nava-Ruiz C., Zaga-Clavellina V., Flores-Espinosa P., Heras-Romero Y., Díaz-Ruiz A., Méndez-Armenta M. Metallothionein expression in the rat brain following KA and PTZ treatment // Environ Toxicol. Pharmacol. 2015. V. 40 (2). P. 530–534.
31. Krezel A., Maret W. Different redox states of metallothionein/thionein in biological tissue // Biochem. J. 2007. V. 402 (3). P. 551–558.
32. Merten K. E., Feng W., Zhang L., Pierce W., Cai J., Klein J. B., Kang Y. J. Modulation of cytochrome C oxidase-*va* is possibly involved in metallothionein protection from doxorubicin cardiotoxicity // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. V. 315 (3). P. 1314–1319.
33. Oliveira V. A., Oliveira C. S., Mesquita M., Pedroso T. F., Costa L. M., Fiuza Tda L., Pereira M. E. Zinc and N-acetylcysteine modify mercury distribution and promote increase in hepatic metallothionein levels // J. Trace Elem. Med. Biol. 2015. V. 32. P. 183–188.
34. Шафран Л. М., Пыхтеев Д. М., Большой Д. В. Роль металлотионеина в развитии токсических нефропатий // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2006. № 2 (4). С. 76–80.
35. Низкодубова С. В., Ласукова Т. В., Легостин С. А. Применение липидов сапропеля для коррекции метаболизма печени крыс при токсикохимическом гепатите // Вестн. Томского гос. пед. ун-та (TSPU Bulletin). 2013. Вып. 8. С. 94–99.
36. Безручко Н. В., Рубцов Г. К. Методология и метод оценки окислительной модификации белков в комплексе с молекулами средней массы, перспективы их применения // Вестн. Томского гос. пед. ун-та (TSPU Bulletin). 2014. Вып. 8. С. 185–189.
37. Рубцов Г. К., Безручко Н. В., Генгин М. Т., Васильков В. Г., Борисова Е. Ю., Анопин К. Д., Васильева А. Д., Садовникова Д. Г., Козлова Г. А., Кручинина А. Д., Гамзин С. С. Способ определения окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы в сыворотке крови, плазме, эритроцитах и в моче. Патент на изобретение № 2525437. Заявка на патент на изобретение Российской Федерации № 2012153044, приоритет от 7.12.2012, решение о выдаче патента от 14.04.2014, заявитель – ГОУ ВПО «Пензенский государственный университет».

Безручко Н. В., профессор.

Пензенский государственный университет.

Ул. Красная, 40, Пенза, Россия, 440066.

E-mail: bnv1976@rambler.ru

Рубцов Г. К., ассистент кафедры.

Пензенский государственный университет.

Ул. Красная, 40, Пенза, Россия, 440066.

E-mail: rubczoff_georgij@yandex.ru

Григорьева О. М., аспирант кафедры.
Пензенский государственный университет.
Ул. Красная, 40, Пенза, Россия, 440066.
E-mail: selena3546@mail.ru

Материал поступил в редакцию 16.09.2015.

N. V. Bezruchko, G. K. Rubtsov, O. M. Grigorieva

METALLOTHIONEIN: RELATIONSHIP WITH OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS AND LIPIDS, MONITORING METHODS

Based on literature data, addresses a wide range of biological functions of metallothioneins, including transport of metals in the body, protection of oxidative stress, as well as their use as a diagnostic test of intoxication, including heavy metals poisoning. Methodologically justified the possible exchange of metallothionein with oxidative modification of proteins and lipids (spontaneous and metal-initiated). Proposed the application of monitoring of appropriate tests in the system, with a certain level of average molecular weight as a parameter of intoxication, including the effects of heavy metals to detect dynamics of metallothionein correlations in the body under the conditions of oxidative stress.

Key words: *metallothioneins oxidative modification of proteins and lipids, monitoring.*

References

1. Ghoshal K., Majumder S., Li Z., Dong X., Jacob S.T. Suppression of metallothionein gene expression in a rat hepatoma because of promoter-specific DNA methylation. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275(1), pp. 539–547.
2. Roel M., Rubiolo J. A., Terson E., Thomas O. P., Vieytes M. R., Botana L. M. Crambescin C1 Exerts a Cytoprotective Effect on HepG2 Cells through Metallothionein Induction. *Mar Drugs.*, 2015, vol. 13(8), pp. 4633–4653.
3. Zhang X., Sha M. L., Yao Y. T., Da J., Ni X. S. Effect of heat shock pretreatment on apoptosis and metallothionein expression in rat cardiomyocytes. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, vol. 8 (5), pp. 7667–7672.
4. Elaeva N. L., Minaeva L. V., Batotsyrenova E. G., Stepanova S. V., Elaeva M. N., Kashuro V. A. K voprosu o roli metallothioneinov kak markerov trenirovannosti k fizicheskoy nagruzke [The role of metallothioneins as markers of fitness to physical activity]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya – Advances in Current Natural Sciences*, 2015, no. 3, pp. 133–136 (in Russian).
5. Biswal M. R., Ahmed C. M., Ildefonso C. J., Han P., Li H., Jivanji H., Mao H., Lewin A. S. Systemic treatment with a 5HT1a agonist induces antioxidant protection and preserves the retina from mitochondrial oxidative stress. *Exp. Eye Res.*, 2015, vol. 140, pp. 94–105.
6. Fabisiak J. P., Borisenko G. G., Liu S. X., Tyurin V. A., Pitt B. R., Kagan V. E. Redox sensor function of metallothioneins. *Methods Enzymol.*, 2002, vol. 353, pp. 268–281.
7. Yang M., Zhang F., Wang F., Dong Z., Cao Q., Chen M. Characterization of a Type 1 Metallothionein Gene from the Stresses-Tolerant Plant *Ziziphus jujube*. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, vol. 16 (8), pp. 16750–16762.
8. Kutuyakov V. A., Salmina A. B. Metallothioneiny kak sensory i regulatory obmena metallov v kletkakh [Metallothioneins as sensors and regulators of metabolism in cells metals]. *Byulleten' sibirskoy meditsiny – Bulletin of Siberian Medicine*, 2014, vol. 13, no. 3, pp. 91–99 (in Russian).
9. Nikol'sky A. V., Pushkareva N. B., Trebenok Z. A., Koterov A. N. Vozmozhny mekhanizm protivoluchevogo effekta metallothioneina: stimulyatsiya replikativnogo sinteza DNK i proliferatsii kletok kostnogo mozga [The possible mechanism of radioprotective effect of metallothionein: stimulation of replicative DNA synthesis and proliferation of bone marrow cells]. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*, 1998, no. 3, pp. 432–437 (in Russian).
10. Smoryzanova O. A., Rott G. M., Savina E. P., Trofimov F. A., Skvortsov V. G., Deeva V. S., Shevchenko L. I. Sintez i metallothioneinogennaya aktivnost' nekotorykh proizvodnykh benzofurana [Synthesis and activity of some derivatives metallothioneinogennaya benzofuran]. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 1998, no. 12, pp. 28–30 (in Russian).
11. Rott G. M., Yuzhakov V. V., Novikova I. S., Neborak Yu. T. Poliklonal'nye antitela k metallothioneinam: poluchenije, spetsifichnost' i immunokrashivaniye na gistologicheskikh srezakh [Polyclonal antibodies to metallothionein: reception, specificity, and immunostaining for histological sections]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, 1998, no. 6, pp. 709–712 (in Russian).
12. Smoryzanova O. A., Kuznetsova M. N., Rott G. M., Ul'yanenko S. E. Vyzhivaemost' myshey i sodержaniye metallothioneinov v ikh pecheni i pochkakh kak kriterii otsenki vozdeystviya impul'snogo neytronnogo izlucheniya [The survival rate of mice and metallothionein content in their liver and kidneys as the criteria for evaluating the effects of a pulsed neutron radiation]. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2000, no. 4, pp. 387–391 (in Russian).
13. Smoryzanova O. A., Budagov R. S., Rott G. M., Ul'yanova L. P. Povyseniye sodержaniya metallothioneinov v pecheni myshey posle vvedeniya khloristogo kadmiya ne zashchischaet ot kombinirovannykh radiatsionno-termicheskikh povrezhdeniy [Increased content of metallothionein in the liver of mice after injection of cadmium chloride does not protect against the combined radiation-thermal injuries]. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2001, no. 6, pp. 671–676 (in Russian).
14. Koterov A. N., Filippovich I. V. Radioadaptivnyy otvet *in vitro* nestimulirovannykh limfotsitov krysa po metallothioneinovomu testu [Radioadaptive response *in vitro* of unstimulated lymphocytes of rat according to metallothionein test]. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya*, 2002, no. 2, pp. 130–135 (in Russian).

15. Smoryzanova O. A., Novikova I. S., Skvortsov V. G., Podgorodnichenko V. K., Petriev V. M. Perspektivy ispol'zovaniya metallotioneina v kachestve khelatiruyushchego agenta dlya razrabotki radiofarmpreparatov na osnove ^{213}Bi [Prospects for the use of metallothionein as a chelating agent for the development of radiopharmaceuticals based on ^{213}Bi]. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy khimii – Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*, 2010, no. 1, pp. 44–49 (in Russia).
16. Frolova N. A., Mirzoev E. B., Kobyalko V. O., Gubina O. A., Mel'nik A. D. Vliyaniye digidrokvertsitina i askorbinovoy kisloty na sodержaniye malonovogo dial'degida i metallotioneinov v organakh krysa, podvergnutykh khronicheskomu vozdeystviyu kadmiya [Influence of dihydroquercetin and ascorbic acid on the content of malondialdehyde and metallothionein in the organs of rats exposed to chronic exposure to cadmium]. *Toksikologicheskij vestnik – Toxicological Review*, 2009, no. 4, pp. 16–19 (in Russia).
17. Kobyalko V. O., Mirzoev E. B., Gubina O. A., Frolova N. A., Ratnikova L. I., Anisimov V. S. Soderzhaniye metallotioneinov v pecheni i pochkakh krysa raznogo vozrasta pri vnutribryushinnom vvedenii nitrata kadmiya [The content of metallothionein in the liver and kidneys of rats of different age by intraperitoneal injection of cadmium nitrate]. *Toksikologicheskij vestnik – Toxicological Review*, 2011, no. 5, pp. 18–21 (in Russia).
18. Mirzoev E. B., Kobyalko V. O., Polyakova I. V., Gubina O. A., Frolova N. A. Soderzhaniye metallotioneinov i obshchego belka v limfotsitakh perifericheskoy krovi ovets pri khronicheskom postuplenii nitrata svintsya s ratsionom [The content of metallothionein and total protein in peripheral blood lymphocytes of sheep with chronic receipt of lead nitrate in the diet]. *Toksikologicheskij vestnik – Toxicological Review*, 2014, no. 6, pp. 36–39 (in Russia).
19. Kut'yakov V. A., Shestakova L. A., Salmina A. B., Chikun V. I. Osobennosti ekspressii metallotioneina v organakh krysa pri intoksikatsii tsinkom i svintsom [Features metallothionein expression in rat organs intoxication zinc and lead]. *Sibirskoye meditsinskoye obozreniye*, 2014, no. 2, pp. 29–33 (in Russia).
20. Shafran L. M., Pykhteev D. M., Bol'shoy D. V. Metallotionein kak biomarker v eksperimente i klinike [Metallothionein as a biomarker in experiment and clinic]. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii – Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*, 2011, no. 9, pp. 60–64 (in Russia).
21. Elaeva N. L., Ivanenko A. A., Belikova V. D., Kashuro V. A., Malov A. M., Sokolyan N. A. Sravnitel'nyy analiz kontsentratsii metallotioneinov v plazme krovi lyudej pri ispol'zovanii dvukh raznykh metodov opredeleniya [Comparative analysis of metallothionein concentration in the blood plasma of people with two different methods of determining]. *Toksikologicheskij vestnik – Toxicological Review*, 2013, no. 4, pp. 22–25 (in Russia).
22. Pykhteeva E. G. Metallotionein: biologicheskiye funktsii. Rol' metallotioneina v transporte metallov v organizme [Metallothionein: biological functions. The role of metallothionein in the transport of metals in the body]. *Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny – Actual Problems of Transport Medicine*, 2009, no. 4 (18), pp. 44–58 (in Russia).
23. Pykhteeva E. G. Metallotionein: biologicheskiye funktsii 2. Rol' metallotioneina v zashchite ot oksidativnogo stressa [Metallothionein: biological functions 2. The role of metallothionein in the defense against oxidative stress]. *Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny – Actual Problems of Transport Medicine*, 2010, no. 1 (19), pp. 114–120 (in Russia).
24. Pykhteeva E. G., Bol'shoy D. V., Samokhina N. A., Stuzhuk E. S., Tret'yakov A. M. Vliyaniye predvaritel'noy induktsii metallotioneina na ustoychivost' AOC organizma belykh krysa pri vozdeystvii toksichnykh produktov goreniya PVH [Influence of pre-induction of metallothionein on the stability of the AOC organism of white rats under the influence of toxic combustion products PVC]. *Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny – Actual Problems of Transport Medicine*, 2010, no. 3 (21), pp. 112–117 (in Russia).
25. Pykhteeva E. G., Potapov E. A., Bol'shoy D. V., Pykhteeva E. D. In vitro modelirovaniye deystviya kadmiya na epitelial'nye kletki pri predvaritel'noy induktsii metallotioneina *in vivo* [In vitro simulation of the action of cadmium on epithelial cells in the pre-induction of metallothionein *in vivo*]. *Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny – Actual Problems of Transport Medicine*, 2011, no. 2 (24), pp. 88–93 (in Russia).
26. Pykhteev D. M., Pykhteeva E. G., Bol'shoy D. V., Samoilenko T. V., Yaremenko E. N. Issledovaniye ekspressii genov metallotioneina v kletochnoy kul'ture fibroblastov pecheni krysa i eye roli v vyzhivaemosti kletok pri ekspozitsii tyazhelymi metallami [Research of metallothionein gene expression in cell culture of fibroblasts of rat liver and its role in cell survival upon exposure of heavy metals]. *Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny – Actual Problems of Transport Medicine*, 2013, no. 3 (33), pp. 119–129 (in Russia).
27. Pykhteeva E. G. Metallotionein: biologicheskiye funktsii 3. Prakticheskoye primeneniye metallotioneina i ego diagnosticheskoye znacheniyе [Metallothionein: biological functions 3. Practical application of metallothionein and its diagnostic value]. *Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny – Actual Problems of Transport Medicine*, 2010, no. 2 (20), pp. 58–63 (in Russia).
28. Göbel H., van der Wal A. C., Teeling P., van der Loos C. M., Becker A. E. Metallothionein in human atherosclerotic lesions: a scavenger mechanism for reactive oxygen species in the plaque? *Virchows Arch.*, 2000, vol. 437 (5), pp. 528–533.
29. Greisen P., Jespersen J. B., Kepp K. P. Metallothionein Zn²⁺- and Cu²⁺-clusters from first-principles calculations. *Dalton Trans.*, 2012, vol. 41 (8), pp. 2247–2256.
30. Juárez-Rebollar D., Manjarrez J., Nava-Ruiz C., Zaga-Clavellina V., Flores-Espinosa P., Heras-Romero Y., Díaz-Ruiz A., Méndez-Armenta M. Metallothionein expression in the rat brain following KA and PTZ treatment. *Environ Toxicol. Pharmacol.*, 2015, vol. 40 (2), pp. 530–534.
31. Krezel A., Maret W. Different redox states of metallothionein/thionein in biological tissue. *Biochem. J.*, 2007, vol. 402 (3), pp. 551–558.
32. Merten K. E., Feng W., Zhang L., Pierce W., Cai J., Klein J. B., Kang Y. J. Modulation of cytochrome C oxidase-va is possibly involved in metallothionein protection from doxorubicin cardiotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, vol. 315 (3), pp. 1314–1319.
33. Oliveira V. A., Oliveira C. S., Mesquita M., Pedrosa T. F., Costa L. M., Fiuzza Tda L., Pereira M. E. Zinc and N-acetylcysteine modify mercury distribution and promote increase in hepatic metallothionein levels. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2015, vol. 32, pp. 183–188.
34. Shafran L. M., Pykhteev D. M., Bol'shoy D. V. Rol' metallotioneina v razvitiі toksicheskikh nefropatij [The role of metallothionein in the development of toxic nephropathy]. *Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny – Actual Problems of Transport Medicine*, 2006, no. 2 (4), pp. 76–80 (in Russia).

35. Nizkodubova S. V., Lasukova T. V., Legostin S. A. *Primeneniye lipidov sapropelya dlya korrektsii metabolizma pecheni krysa pri toksiko-khimicheskom gepatite* [Correction of energy metabolism impairments in tetrachlormethane-poisoned rat liver tissue by means of sapropel lipids]. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta – TSPU Bulletin*, 2013, vol 8, pp. 94–99 (in Russia).
36. Bezruchko N. V., Rubcov G. K. *Metodologiya i metod otsenki oksislitel'noy modifikatsii belkov v komplekse s molekulami sredney massy, perspektivy ikh primeneniya* [Methodology and method of evaluation of oxidative modification of proteins in complex with of average weight molecules, the prospects for their use]. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo pedagogicheskogo universiteta – TSPU Bulletin*, 2014, vol. 8, pp. 185–189 (in Russia).
37. Rubtsov G. K., Bezruchko N. V., Gengin M. T., Vasil'kov V. G., Borisova E. Y., Anopin K. D., Vasilieva A. D., Sadovnikova D. G., Kozlova G. A., Kruchinina A. D., Gamzin S. S. *Sposob opredeleniya oksislitel'noy modifikatsii belkov v pule veshchestv sredney molekulyarnoy massy v syvorotke krovi, plazme, eritrotsitakh i v moche* [A method for determining oxidative modification of proteins in pool average molecular weight substances in blood serum, plasma, and red blood cells in urine]. Patent na izobreteniyе № 2525437. Zayavka na patent na izobreteniyе Rossiyskoy Federatsii № 2012153044, proiritet ot 7.12.2012, resheniye o vydache patenta ot 14.04.2014, zayavitel' – GOU VPO "Penzenskiy gosudarstvennyy universitet" [The patent for the invention no. 2525437. Patent application for the invention of the Russian Federation no. 2012153044, priority of 12.07.2012, the decision to grant a patent on 04.14.2014, the applicant – Penza State University] (in Russia).

Bezruchko N. V.

Penza State University.

Ul. Krasnaya, 40, Penza, Russia, 440066.

E-mail: bnv1976@rambler.ru

Rubtsov G. K.

Penza State University.

Ul. Krasnaya, 40, Penza, Russia, 440066.

E-mail: rubczoff.georgij@yandex.ru

Grigorieva O. M.

Penza State University.

Ul. Krasnaya, 40, Penza, Russia, 440066.

E-mail: selenas3546@mail.ru