

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

МЕТАЛЛОЛИГАНДНЫЙ ГОМЕОСТАЗ В ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ У ЛИКВИДАТОРОВ АВАРИИ НА ЧЕРНОБЫЛЬСКОЙ АЭС

METAL-LIGAND HOMEOSTASIS IN EPIDERMIC CELLS OF CHERNOBYL ACCIDENT LIQUIDATORS

В.И. Петухов^{1*}, Е.В. Дмитриев³, И.Я. Калвинш¹, Л.Х. Баумане¹, Е.Д. Рестэ², Т.Я. Звагуле², А.П. Шкестерс², Е.В. Лакарова⁴, А.В. Скальный^{4,5}

V.I. Petukhov^{1*}, E.V. Dmitriev³, I. Kalvinsh¹, L.Kh. Baumane¹, E.D. Reste², T. Zvagule², A.P. Skesters², E.V. Lakarova⁴, A.V. Skalny^{4,5}

¹ Латвийский институт органического синтеза, Рига, Латвия

² Рижский университет Страдыня, Рига, Латвия

³ Институт вычислительной математики РАН, Москва, Россия

⁴ Оренбургский государственный университет, Оренбург

⁵ АНО «Центр биотической медицины», Москва, Россия

¹ Latvian Institute of Organic Synthesis, Riga, Latvia

² Riga's Stradin's University, Riga, Latvia

³ Institute of Numerical Mathematics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Orenburg State University, Orenburg, Russia

⁵ ANO «Centre of Biotic Medicine», Moscow, Russia

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: металлолигандный гомеостаз, окислительный и нитрозирующий стресс, К—Zn корреляция

KEYWORDS: metal-ligand homeostasis, oxidative and nitrosative stress, K—Zn correlation

РЕЗЮМЕ: В настоящей работе на базе данных атомно-эмиссионной спектрометрии волос у 954 ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС и 947 здоровых лиц была сделана попытка выявить линейную связь между концентрационными значениями калия (K) и натрия (Na), K и цинка (Zn). Негативная K—Zn корреляция, а также увеличение в эпидермисе K и Na и уменьшение кальция (Ca) и Zn, по мнению авторов, могут косвенно свидетельствовать об участии мембранных АТФаз (P-типа) и служить дискриминаторами окислительного и нитрозирующего стресса.

ABSTRACT: The present article is an attempt to reveal connection (Pearson) between potassium (K) and sodium (Na), K and zinc (Zn) levels on the basis of analytical determination of elemental content in human scalp hair (atomic emission spectrometry in 954 Chernobyl accident liquidators and 947 healthy persons). Negative K—Zn correlation and also increase in epidermal cells K and Na and reduction of calcium (Ca) and Zn can indirectly testify, in the authors' opinion, to

participation of membrane ATPases (P-type) in the origin of metal-ligand homeostasis shifts and serve as oxidative and nitrosative stress discriminators.

ВВЕДЕНИЕ

Анализ динамических характеристик металлолигандного гомеостаза в различных биосубстратах представляет собой интригующий и практически не изученный раздел современной элементологии. Проведение такого анализа, разумеется, не может ограничиваться (при бесспорной важности подобной информации) лишь количественной оценкой содержания в субстрате тех или иных металлов. Не менее актуальными являются данные о самих металлолигандных комплексах, и в первую очередь о металлопротеидах — главных участниках внутри- и внеклеточных событий металлолигандного гомеостаза.

Известно, что пребывание металлов в организме в «свободной» форме (в виде ионов) оказывается практически под запретом даже для таких «жизненно важных» металлов, как медь (Cu), цинк

* Адрес для переписки: Петухов Валерий Иванович, д.м.н., проф.; E-mail: vip-val@yandex.ru

(Zn), магний (Mg) и др., не говоря уже о кадмии (Cd) и ртути (Hg), все еще сохраняющих в литературе определение «токсичных» (Palumaa et al., 2002). Как показали недавние эксперименты на модели дрожжевых клеток, концентрация свободных ионов меди в их цитоплазме была менее чем $10^{-18}M$, т.е. менее 1 атома Cu на клетку (O'Halloran, Culotta, 2000).

В то же время принципиального различия в токсическом действии Zn^{2+} или Cu^+ на клетку по сравнению с Cd^{2+} и Hg^{2+} , по-видимому, не существует. Речь, скорее всего, идет о тех или иных сбоях при связывании металлов специализированными белковыми молекулами (металлотioneины, металлошапероны) и/или о неэффективном процессе выведения этих ионов из клетки с участием мембранных АТФаз.

Главная роль в связывании (детоксикации) металлов в организме (как внутри, так и вне клетки) принадлежит металлотioneинам (МТ) — низкомолекулярным белкам (6—7 кДа), в которых 20 из 60—68 аминокислотных остатков представлены цистеином. Начиная с 1957 г., когда был впервые обнаружен Cd,Zn-содержащий МТ (Margoshes, Vallee, 1957), появляются новые данные об участии МТ в металлолигандном гомеостазе.

Было установлено, что МТ, наряду с обезвреживающей функцией по отношению к тяжелым металлам и/или металлам с переменной валентностью (Fe, Cu), осуществляют защиту клеточных структур от повреждающего действия кислородных и азотных радикалов (Cai et al., 2000; Kang, 2006), влияют на активность ядерного фактора транскрипции NF-κB, принимают участие в регенерации печеночных и нервных клеток (West et al., 2004; Oliver et al., 2005), оказывают корректирующее влияние на гуморальный и клеточный иммунитет (Lynes et al., 1993; Youn, Lynes, 1999).

Индущирующий эффект на синтез МТ в клетке (кроме самих металлов, а также кислородных и азотных радикалов) оказывают глюкокортикоиды, провоспалительные цитокины (ФНО-α, ИЛ-1), α-интерферон (Friedman, Stark, 1985; Karin et al., 1985; Sato et al., 1992, 1996).

Выделяют 4 класса МТ. Два из них: МТ-1 и МТ-2 экспрессируются у млекопитающих почти во всех тканях. Они играют ключевую роль в гомеостазе Zn^{2+} , Cu^+ , Cd^{2+} и Hg^{2+} . Два других — МТ-3 и МТ-4 — имеют тканевую специфичность: нервная (ЦНС) и эпителиальная ткань соответственно (Palmer, 1988). Ионы Zn^{2+} сравнительно легко оказываются в молекуле МТ, и считается, что так же легко могут быть вытеснены избытком Cd^{2+} при определенных условиях.

Соотношение металла и тиолов в МТ не носит случайный характер. Примерно 1 атом Cu приходится на 2 цистеиновых остатка в Cu-содержащем МТ (Cu-МТ) и 1 атом Cd или Zn на 3 цистеиновых остатка в Cd,Zn-содержащем МТ (Cd/Zn-МТ). В Cu-МТ каждый атом меди имеет тригональ-

ное окружение из атомов серы (S); а в Cd/Zn-МТ аналогичные образования имеют структуру тетраэдра.

Структурная упорядоченность молекулы металлопротеидов (МП) допускает существование линейных связей между металлами, входящими в состав МП. Эти связи могут служить своеобразными «маркерами» МП и обнаруживаться с помощью корреляционного анализа (Pearson) концентрационных значений металлов в том или ином биосубстрате. Нам представляется, что такой подход может оказаться продуктивным для изучения динамических изменений металлолигандного гомеостаза как в условиях нормы, так и в различных патологических ситуациях. Используя этот прием, можно было бы проследить за изменениями металлолигандного гомеостаза в таком биосубстрате, как эпидермис, в условиях хронического окислительного и нитрозирующего стресса (например, у ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС). При этом объектом для непосредственных измерений концентраций интересующих нас металлов могли бы быть дериваты эпидермиса (волосы). Правда, в этом случае приходится допустить, что соотношение концентраций металлов в эпидермисе в целом соответствует таковому в волосах. Такое допущение выглядит оправданным и может быть проверено в ходе дальнейших наблюдений. Преимущества же использования волос для неинвазивного и ретроспективного наблюдения за сдвигами в металлолигандном гомеостазе эпидермальных клеток очевидны и были бы особенно уместны в массовых (популяционных) исследованиях.

Глубину ретроспекции в подобных наблюдениях можно оценить исходя из средней скорости роста человеческого волоса ~0,2 мм/сут.: образец волос длиной ~3 см позволяет судить о событиях, происходивших в эпидермисе на протяжении последних 5 месяцев.

Вместе с тем сам выбор субстрата для проведения элементного анализа (волосы) требует осторожности при трактовке результатов исследования.

Известно, что эпителий (с его придатками), принимающий участие в поступлении и выведении химических элементов из организма, является территорией, где не могут не проявлять себя регуляторные механизмы металлолигандного гомеостаза. Поэтому увеличение удельного количества металлов (или других химических элементов) в волосах, если оно не вызвано внешними причинами, может быть истолковано:

1) нормальным функционированием систем регуляции металлолигандного гомеостаза (например, ускоренное выведение металла в ответ на избыточное поступление его с пищей);

2) срывом регуляторных механизмов, которые способствуют удерживанию металла в организме, что приводит к развитию металлодефицитных состояний.

В свою очередь, при недостаточном поступлении того или иного металла извне (или из имеющихся во внутренней среде организма хелатных комплексов) нормальная работа системы регуляции гомеостаза будет направлена на удержание металла во внутренней среде организма (минимизация потерь), что может проявиться снижением удельного количества металла в таком биосубстрате, как волосы.

Как отличить регистрируемые при спектрометрии волос (в довольно широком диапазоне) колебания концентраций химических элементов, присущие нормальной гомеостатической регуляции, от патологических сдвигов — признаков элементного дисбаланса? Где находятся отличительные критерии этих сдвигов?

Ответы на эти вопросы еще предстоит получить. Однако уже сегодня приходится признать, что экстраполировать на весь организм данные спектрометрии волос или, другими словами, диагностировать «тотальный» элементный дисбаланс, основываясь только на количественной оценке минерального состава волос («больше — меньше»), вряд ли оправдано.

Такая экстраполяция применима, пожалуй, только при выраженном (тотальном) дефиците или избытке тех или иных элементов, когда в большинстве тканей можно обнаружить грубые нарушения минерального состава.

Поэтому существенным шагом вперед (в теоретическом и особенно в практическом плане) могла бы стать сама возможность использования результатов спектрометрии волос для ретроспективной оценки событий металлолигандного гомеостаза в клетках эпидермиса. Другими словами, в случае вполне предсказуемой идентичности элементного состава эпидермиса и его придатков (волосы), последние могли бы быть надежным и доступным источником информации о минеральном статусе эпидермальных клеток.

В настоящей работе сделана попытка выявить парные линейные корреляции между концентрационными значениями натрия (Na) и калия (K), а также K и Zn, чтобы получить косвенное подтверждение участия мембранных АТФаз (P-тип) в наблюдаемых на фоне окислительного и нитрозирующего стресса изменениях металлолигандного гомеостаза.

С этой целью были использованы данные атомно-эмиссионной спектрометрии волос у ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС и у здоровых лиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В «Центре биотической медицины» (Москва) на приборе Optima 2000 DV (Perkin Elmer Inc., США) был сделан анализ минерального состава волос методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной аргоновой плазмой

(ИСП-АЭС) у 947 здоровых лиц (238 мужчин и 709 женщин в возрасте от 2 до 86 лет), а также у 954 ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС — жителей Москвы (213 женщин и 741 мужчина в возрасте от 37 до 82 лет).

Кроме того, для выявления возможных возрастных и половых различий с помощью ИСП-АЭС был сделан анализ минерального состава волос у 402 здоровых лиц — жителей Риги (80 мужчин и 322 женщины в возрасте от 2 до 86 лет). Все исследуемые были разделены по возрасту на 3 группы: I группа — от 2 до 32 лет ($n=154$); II группа — от 33 до 44 лет ($n=127$) и III группа — от 45 до 86 лет ($n=121$). Сравнительный анализ данных спектрометрии проводился как в разных половых, так и в двух крайних возрастных группах: I и III.

Проверку гипотезы о нормальном распределении проводили с помощью критериев Жака—Бера (Bera, Jarque, 1980) и Колмогорова—Смирнова (Lilliefors, 1967). При статистической обработке данных спектрометрии мы не использовали стандартные статистические методы (t -критерий), так как в результате проверки гипотезы о принадлежности выборки нормальному распределению каждого из химических элементов у всех из них, за исключением цинка (Zn), удается с большой вероятностью опровергнуть гипотезу о нормальном распределении (Петухов и др., 2006). Поэтому применялись альтернативные подходы (bootstrap methods), не требующие нормального распределения априорного ансамбля (Davison, Hinkley, 1997). Корреляционный анализ проводили с помощью стандартных пакетов компьютерных программ: Excel и Matlab.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При сравнительном анализе половых и возрастных различий в минеральном составе волос у здоровых лиц были получены следующие результаты.

Интервальная оценка средней концентрации в волосах здоровых лиц таких элементов, как кальций (Ca), магний (Mg), марганец (Mn), фосфор (P), олово (Sn) и ванадий (V), достоверно различалась у мужчин и женщин (табл. 1). Возрастные различия в двух крайних возрастных группах (I и III) ограничивались лишь Mg (табл. 2).

Полученные результаты указывают на необходимость соблюдать уже упомянутую осторожность в обобщающих оценках минерального статуса «всего организма» по данным спектрометрии волос. Ведь сам факт большего (по сравнению с мужчинами) содержания Ca в волосах женщин еще не свидетельствует об имеющемся у них благополучии в кальциевом гомеостазе костной ткани, где находится 99% этого макроэлемента.

Сравнительный анализ средних концентрационных значений 23 химических элементов в волосах здоровых лиц и ликвидаторов аварии на Чер-

Таблица 1. Половые различия в минеральном составе волос у здоровых лиц

Элемент	Содержание (мкг/г)	
	Мужчины (n = 80)	Женщины (n = 322)
Ca	521,1 < 749,1 < 1125,4	1410,9 < 1537,5 < 1666,4
Mg	59,9 < 73,4 < 89,6	169,6 < 188,9 < 209,1
Mn	0,55 < 0,73 < 0,97	1,33 < 1,61 < 1,96
P	146,3 < 154,3 < 161,8	134,7 < 139,2 < 143,9
Sn	0,14 < 0,18 < 0,21	0,52 < 0,85 < 1,34
V	0,09 < 0,12 < 0,15	0,06 < 0,07 < 0,08

Примечание: здесь и далее в таблицах данные приведены в виде $T1 < M < T2$, где M — среднее значение, $T1$ и $T2$ — границы доверительного интервала (bootstrap-метод).

Таблица 2. Возрастные различия в минеральном составе волос у здоровых лиц

Возрастные группы	Mg (мкг/г)
Группа I (n = 154) мужчины — 32 (20,8%); женщины — 122 (79,2%)	120,9 < 141,9 < 166,1
Группа III (n = 121) мужчины — 26 (21,5%); женщины — 95 (78,5%)	168,9 < 203,4 < 243,4

нобыльской АЭС (по данным ИСП-АЭС) был сделан с использованием интервальной оценки (Davison, Hinkley, 1997). Результаты представлены в таблице 3.

Как следует из таблицы 3, содержание практически всех исследованных элементов в волосах ликвидаторов аварии достоверно отличается от нормы. Обращает внимание, что концентрация эссенциальных металлов (Cu, Zn, Mg и др.) в волосах ликвидаторов ниже нормы, а так называемых «токсичных» (Cd, Pb, Sn) превышает нормальные размеры.

Что стоит за этими сдвигами? Можно ли их считать явными сбоями в металлолигандном гомеостазе или следует рассматривать в качестве своеобразной компенсаторной реакции организма, направленной в условиях окислительного и нитрозирующего стресса на удержание в организме жизненно важных элементов и избавление от менее важных или потенциально опасных?

Чтобы попытаться ответить на эти вопросы, мы постулировали следующие положения, основанные на данных литературы и собственных наблюдениях.

1. Основным отличительным признаком происходящих в организме чернобыльцев биохимических процессов является повышенная, по сравнению с нормой, активность кислородных и азот-

ных радикалов или хронический окислительный и нитрозирующий стресс, имеющие непосредственное отношение к наблюдаемым в клетке и/или за ее пределами событиям металлолигандного гомеостаза.

2. Ключевую роль в металлолигандном гомеостазе играют металлопротеиды (МТ, шапероны, металлоферменты).

3. Если допустить, что соотношение металлов (а следовательно, и их белковых лигандов) в волосах идентично таковому в собственно эпидермальных клетках (и это допущение может быть подтверждено дальнейшими исследованиями), то появляется реальная возможность судить о событиях в металлолигандном гомеостазе эпидермиса по изменениям минерального состава волос.

4. Линейные корреляции в паре «металл-металл» или «металл-протеин» могут служить дополнительной характеристикой их внутриклеточных взаимоотношений и/или косвенным свидетельством структурных связей металлов (например, в составе молекулы МТ).

Требуют пояснения некоторые особенности обнаружения линейных связей между металлами по результатам спектрометрии волос (Петухов и др., 2008).

Было установлено, что при уменьшении размера выборки (до $n = 100$) количество выявляемых значимых линейных связей кратно возрастает по сравнению с общей группой ($n \approx 1000$). Это указывает на то, что основная масса этих корреляций носит случайный характер и зависит от размеров выборки. Это обстоятельство определило следующие правила проведения корреляционного анализа.

Для выявления наибольшего количества значимых корреляций генеральные совокупности спектрометрических данных (в наших наблюдениях $n = 947$ и $n = 954$) подлежали неоднократному «перемешиванию» («встряхиванию»). Это «перемешивание» проводилось по специально созданным форматам (стандартам). Для этого в ге-

Таблица 3. Интервальная оценка среднего содержания (мкг/г) химических элементов в волосах у ликвидаторов чернобыльской аварии по сравнению со здоровыми лицами

Элемент	Здоровые (n = 947)	Ликвидаторы аварии (n = 954)
Al	8,1 < 8,77 < 9,5	19,3 < 20,1 < 20,9 ↑*
As	0,07 < 0,09 < 0,13	0,38 < 0,40 < 0,43 ↑*
Be	0,007 < 0,008 < 0,01	0,008 < 0,01 < 0,02
Ca	1176,8 < 1249 < 1318,9	623,4 < 654,8 < 685,2 ↓*
Cd	0,04 < 0,05 < 0,06	0,23 < 0,25 < 0,29 ↑*
Co	0,04 < 0,05 < 0,06	0,14 < 0,15 < 0,16 ↑*
Cr	0,48 < 0,51 < 0,54	0,85 < 0,9 < 0,92 ↑*
Cu	19,06 < 20,7 < 22,3	10,6 < 10,99 < 11,4 ↓*
Fe	19,3 < 21,07 < 23,1	22,4 < 23,7 < 25,07 ↑
K	277,4 < 317,7 < 361,1	366,9 < 395,4 < 424,7 ↑*
Li	0,03 < 0,04 < 0,05	0,053 < 0,06 < 0,062 ↑*
Mg	125,5 < 134,3 < 143,2	43,9 < 46,8 < 49,9 ↓*
Mn	1,02 < 1,17 < 1,3	0,74 < 0,8 < 0,86 ↓*
Na	427,9 < 480,9 < 542,9	757,5 < 822,3 < 892,4 ↑*
Ni	0,53 < 0,62 < 0,73	0,41 < 0,46 < 0,51 ↓*
P	144,3 < 146,8 < 149,5	150,8 < 153 < 155,4 ↑*
Pb	1,04 < 1,1 < 1,27	1,5 < 1,8 < 2,2 ↑*
Se	0,62 < 0,91 < 1,3	1,46 < 1,55 < 1,65 ↑*
Si	44,7 < 48,5 < 52,7	18,4 < 19,9 < 21,6 ↓*
Sn	0,39 < 0,51 < 0,7	0,91 < 0,96 < 1,0 ↑*
V	0,06 < 0,072 < 0,077	0,10 < 0,11 < 0,12 ↑*
Ti	0,84 < 1,17 < 1,66	0,49 < 0,54 < 0,59 ↓*
Zn	181,5 < 185,2 < 189,3	162,4 < 165,7 < 168,8 ↓*

* Различие достоверно.

неральной совокупности (применительно к каждому наблюдению и в каждой из возможных пар химических элементов) находили отношение их концентраций. Важно при этом, чтобы сумма числителей в каждом ряду отношений, найденных для данной пары, была бы больше суммы знаменателей.

Набор таких пар, определяемый числом сочетаний из m по 2 (где m — количество анализируемых химических элементов) представляет собой набор форматов для «перемешивания» генеральной совокупности. При $m = 23$ (как в нашем случае) число форматов равняется 253.

В настоящем исследовании были использованы только следующие 20 форматов: Mg/Pb, Al/As, Cu/As, As/Cd, K/As, Zn/Li, Ca/Al, K/Mg, Fe/Cu, Fe/Cd,

Si/Cr, Cr/Co, Si/Ni, Si/Se, Na/Mn, P/Ni, Si/Co, P/Si, Na/Se, Ni/Cr.

«Ранжирование» (или «форматирование») индивидуальных данных в каждом из полученных форматов происходило в соответствии с величиной отношения концентраций химических элементов, образующих данную пару, по принципу «убывания» («от большего к меньшему»). Оптимальный размер выборки для выявления парных корреляций ~100 человек.

В том же порядке («от большего к меньшему») формировались группы для анализа парных корреляций. Например, если в общей совокупности число наблюдений ≈ 1000 человек, то в 1-ю группу входили №№ 1—100, во 2-ю №№ 101—200, в 3-ю №№ 201—300 и т.д.

Корреляции между химическими элементами, образующими формат «перемешивания» (и только в рамках данного формата), не учитывались, поскольку, как показал опыт, при таком способе форматирования происходит искусственное завышение коэффициента Пирсона r .

После нахождения r во всех группах и в обеих генеральных совокупностях (здоровые лица и ликвидаторы аварии) отдельно для интересующей нас парной связи создавали новую общую совокупность, куда отбирались только группы с $r > 0,2$. В этой вновь сформированной для данной исследуемой пары совокупности производилась дальнейшая селекция результатов спектрометрии в зависимости от величины r .

С этой целью для каждого индивидуального наблюдения находили так называемый «коэффициент частотности» (КЧ), равный числу повторов данного наблюдения в анализируемой совокупности. При отсутствии повторов — КЧ=0, при одном повторе — КЧ=1, при двух повторах — КЧ=2 и т.д. При этом близкие к нулю значения r для исследуемой связи обнаруживались как раз среди тех наблюдений, где отсутствовали повторы (КЧ=0) или их число было минимальным. В то же время максимальному числу повторов соответствовали и максимальные значения коэффициента r . Такой подход позволял сравнительно легко выделять из общего числа наблюдений лиц с отсутствием или наличием искомой линейной связи между концентрациями химических элементов.

Наряду с измерением парных корреляций между металлами нас интересовали и концентрации этих металлов в волосах, соответствующие тем или иным значениям r . При этом особый интерес вызвали возможные отличия выявляемых показателей от нормы у ликвидаторов чернобыльской аварии. Такие отличия могли бы претендовать на роль дискриминаторов хронического окислительного и нитрозирующего стресса, если деструктивное действие активных форм кислорода и азота

распространяется на металлолигандный гомеостаз эпидермальных клеток.

При проведении корреляционного анализа нас в первую очередь интересовали связи между концентрационными значениями Zn, K и Na. Заметим, что Zn входит в молекулу МТ, а линейная связь между концентрациями K и Na в волосах, по нашим предварительным наблюдениям (Петухов и др., 2008), отличается постоянством, сравнительно высокими значениями коэффициента r (0,6—0,7) и не зависит от размера выборки. Вместе с тем K—Na связь зависит от вида биосубстрата: обнаруживается в волосах и отсутствует в плазме. Это позволяет допустить, что данная корреляция отражает прямо или косвенно хорошо отлаженную работу устойчивых и постоянно присутствующих в клетке мембранных Na, K-АТФаз, обеспечивающих трансмембранный трафик металлов.

Было интересно выяснить, существуют ли корреляционные взаимоотношения между K и Zn и каков их характер у чернобыльцев и у здоровых лиц?

Полученные результаты не только подтвердили существование K—Zn связи, но и обнаружили различия в ее проявлении в сравниваемых группах. Так, негативная линейная связь между K и Zn ($r = -0,43$; $p < 0,05$) отчетливо выявлялась только у 18,1% практически здоровых лиц; у 36,3% она была мало заметной ($r = -0,23$; $p < 0,05$) и у 45,6% отсутствовала вовсе ($r = -0,05$).

В то же время K—Zn корреляция была негативной и значимой (r от $-0,41$ до $-0,62$; $p < 0,05$) у абсолютного большинства ликвидаторов аварии (88%); а у 12% чернобыльцев она не выявлялась ($r = -0,03$). При этом K—Zn связь при наибольшем $|r|$ (как у чернобыльцев, так и у здоровых лиц) сочеталась с достоверно более высоким уровнем K и Na и более низким — Zn, чем у лиц с отсутствием K—Zn корреляции (см. табл. 4).

Показательно, что с нарастанием КЧ (табл. 5—6) меняется величина $|r|$ у K—Zn связи, а также

Таблица 4. K—Zn связь и концентрационные значения K, Na и Zn (мкг/г) в волосах у ликвидаторов аварии и здоровых лиц

Группы	Коэффициент корреляции (r) и выявляемость [%] K—Zn связи при данном r	Калий (K)	Натрий (Na)	Цинк (Zn)
Здоровые	$r = -0,05$ [45,6%] ($n = 432$)	92,2 < 125,3 < 165,8	183,8 < 209 < 243,2	194,3 < 200,1 < 205,7
	$r = -0,43$ [18,1%] ($p < 0,05$) ($n = 171$)	729,0 < 894 < 1084,5	996,2 < 1233,9 < 1474,1	143,5 < 150,7 < 158,1
Ликвидаторы аварии	$r = -0,03$ [12,0%] ($n = 115$)	102,5 < 150,5 < 208,3	199,4 < 261,8 < 328,0	172,3 < 183,5 < 194,5
	$r = -0,62$ [21,5%] ($p < 0,05$) ($n = 205$)	502,9 < 578,1 < 660,5	982,7 < 1131,3 < 1286,4	153,5 < 159,3 < 165,4

Примечание: в таблице представлены только крайние (max и min) значения r .

Таблица 5. К—Zn связь и концентрация металлов (средние значения, мкг/г) в эпидермальных клетках у здоровых лиц в зависимости от коэффициента частотности (КЧ)

№ п/п	КЧ	n	r	Cu	K	Na	Zn	Ca _м	Ca _ж	Mg _м	Mg _ж
1—253	4—10	253	-0,01	21,0	127,0	197,8	204,3	915,3	1737,9	93,9	171,0
254—432	11	179	-0,17	23,1	122,9	224,8	194,2	938,5	1463,8	92,3	151,6
433—619	12	187	-0,20	21,5	210,8	356,8	189,4	719,5	1287,0	76,3	141,1
620—776	13	157	-0,24	21,5	346,8	557,0	176,8	900,2	1234,8	107,0	145,1
777—872	14	96	-0,31	16,8	522,9	943,2	164,0	1040,1	970,8	116,0	109,9
873—947	15—17	75	-0,44	15,0	1368,9	1605,9	133,6	637,0	915,2	72,9	138,6

Примечание: Ca_м и Mg_м — концентрации Ca и Mg у мужчин; Ca_ж и Mg_ж — у женщин.

Таблица 6. К—Zn связь и концентрация металлов (средние значения, мкг/г) в эпидермальных клетках у ликвидаторов аварии в зависимости от коэффициента частотности (КЧ)

№ п/п	КЧ	n	r	Cu	K	Na	Zn	Ca _м	Ca _ж	Mg _м	Mg _ж
1—115	6—11	115	-0,03	10,9	150,5	261,8	183,5	706,5	1418,8	47,1	119,6
116—229	12	154	-0,31	10,8	224,9	477,2	177,4	592,9	1081,7	38,2	89,1
270—503	13	234	-0,43	11,2	394,9	833,2	158,6	595,5	910,5	40,3	64,6
504—749	14	246	-0,43	10,9	464,8	1036,3	162,4	531,2	710,8	35,5	55,9
750—954	15—17	205	-0,62	11,0	578,1	1131,3	159,3	537,7	611,3	40,5	44,6

средние концентрационные значения не только K, Na и Zn, но и некоторых других металлов.

Отрицательная корреляция между K и Zn означает, что в ответ на снижение внутриклеточной концентрации цинка должна пропорционально возрастать концентрация калия в клетке. Этот факт требует более подробного обсуждения. Однако здесь ограничимся лишь допущением, что наиболее вероятной причиной таких взаимоотношений между K и Zn может быть повышение продукции оксида азота (NO), избирательно высвобождающего Zn из молекулы MT.

Наряду с этим под действием NO, по-видимому, иницируются и процессы трансмембранного трафика металлов (Zn — из клетки, K — в клетку), активное участие в которых принимают транспортные белки (металлошапероны) и мембранные АТФазы (Kawano et al., 2009).

Если допустить, что линейная зависимость между Na и K обязана своим появлением согласованной работе мембранных Na, K-АТФаз, то появляется оправданный интерес к сравнительному анализу корреляционных взаимоотношений между K и Zn у чернобыльцев и у здоровых лиц, поскольку Na, K-АТФаза и мембранная помпа для Zn (хоть и представляют разные подгруппы) принадлежат одному типу (Р-типу) АТФаз.

Негативный характер связи между концентрационными значениями K и Zn в обеих совокупностях может свидетельствовать, на наш взгляд, о

повышенной активности АТФаз (Р-типа) в трансмембранном разнонаправленном переносе K⁺ и Zn²⁺ в условиях окислительного и нитрозирующего стресса. В этой связи уместно привести данные исследования редокс-статуса ликвидаторов чернобыльской аварии, полученные ранее в биохимической лаборатории Рижского университета Страдыня (Kumetova et al., 2000) (см. табл. 7).

Как следует из таблицы 7, анализ редокс-статуса ликвидаторов аварии свидетельствует о заметном и растянутом во времени прооксидантном сдвиге (хронический окислительный стресс), который не удается полностью ликвидировать даже после длительного приема антиоксидантов.

В то же время, если согласиться с допущением, что негативная К—Zn связь может косвенно свидетельствовать о повышенной продукции в клетке кислородных и азотных радикалов, то требует объяснения тот факт, что как минимум 18,1% здоровых лиц, по нашим данным (см. табл. 4), в этом отношении мало чем отличаются от ликвидаторов аварии.

Не очень ясно также, почему с нарастанием $|r_{K-Zn}|$ падает содержание Ca в эпидермисе, причем в обеих исследуемых группах и независимо от пола (см. табл. 5—6).

Здесь уместно вспомнить о довольно тесных взаимоотношениях NO с внутриклеточным кальциевым гомеостазом: через активацию растворимой гуанилат-циклазы (pГЦ), циклического гуанозин-монофосфата (цГМФ), цГМФ-зависимой

Таблица 7. Редокс-статус ликвидаторов чернобыльской аварии

Показатели [Ед.]	Норма	1998—1999 гг.	2007 г.*
Люминолзависимая хемилюминесценция плазмы (LOO., LOOH) [МЕ]	< 80	210,0 ± 30,7	121,7 ± 10,8
Окисляемость плазмы [МЕ]	< 200	450,0 ± 44,8	440,6 ± 51,8
Липидная пероксидация [МЕ]	< 4,0	9,94 ± 1,01	6,67 ± 0,71
Уровень Se в плазме [мкг/л]	80—120	56,1 ± 3,3	79,8 ± 3,9
Se-зависимая глутатионпероксидаза (Se-GSH-Px) в плазме [МЕ/л]	450—600	380,0 ± 19,4	398,0 ± 21,8
Se-зависимая глутатионпероксидаза (Se-GSH-Px) в крови [МЕ/г Hb]	35—50	26,1 ± 1,98	38,25 ± 1,84

* На фоне препаратов Se и натуральных антиоксидантов.

протеинкиназы (PKG-I) и Ca²⁺АТФазы (Северина, 1998). Одним из конечных эффектов NO-зависимого запуска этого сигнального пути (по крайней мере, для мышечных клеток) является усиленный выход Ca из клетки.

Проведенный нами сравнительный анализ концентрационных значений Ca у лиц с выявленной отрицательной K—Zn корреляцией и отсутствием таковой (отдельно для мужчин и женщин) показал, что независимо от пола испытуемых в группах с $r_{K-Zn} = -0,43$ (здоровые) и с $r_{K-Zn} = -0,62$ (ликвидаторы аварии) концентрация Ca в волосах была заметно ниже, чем с $r_{K-Zn} = -0,05$ (здоровые) и с $r_{K-Zn} = -0,03$ (ликвидаторы аварии). Достоверность этого различия удалось подтвердить (в трех из четырех случаев) с помощью интервальной оценки средней (bootstrap-метод). Так, у здоровых мужчин среднее содержание Ca в группе с $r_{K-Zn} = -0,05$ было 934,7 [745,0—1137,5] мкг/г, а в группе с $r_{K-Zn} = -0,43$ —856,9 [633,9—1107,1] мкг/г (в квадратных скобках — интервальная оценка средней по bootstrap-методу). У здоровых женщин с $r_{K-Zn} = -0,05$ этот показатель был равен 1627,8 [1486,8—1776,5] мкг/г, а с $r_{K-Zn} = -0,43$ — только 946,8 [787,1—1128,5] мкг/г (см. табл. 8).

В группе чернобыльцев с общим для мужчин и женщин коэффициентом $r_{K-Zn} = -0,03$: уровень Ca был соответственно 706,5 [622,9—803,4] и 1418,8 [1059,5—1815,8], тогда как с $r_{K-Zn} = -0,62$: Ca у мужчин — 537,7 [506,1—570,4] мкг/г, а у женщин — всего 611,3 [508,1—793,3] мкг/г.

Полученные результаты не противоречат нашему предположению, что отрицательная линейная связь между K и Zn, в сочетании с достоверным снижением уровня Ca, может свидетельствовать об активизации в клетке радикальных процессов с участием NO.

Существование взаимосвязи между концентрационными значениями Ca, K и Zn можно выявить и не прибегая к корреляционному анализу. Для этого необходимо в обеих генеральных совокупностях (и отдельно для мужчин и женщин) сравнить средние значения K и Zn при заведомо низком уровне Ca (меньшим, чем нижняя граница интервальной оценки средней по bootstrap-методу) с теми же показателями в оставшейся выборке. Результаты сравнительного анализа представлены в таблицах 9 и 10.

Таблица 8. K—Zn связь и концентрация Ca в эпидермальных клетках

Группы	Коэффициент корреляции (r)	Кальций (Ca), мкг/г	
		Мужчины	Женщины
Здоровые	$r = -0,05$ (n = 432)	745,0 < 934,7 < 1137,5	1486,8 < 1627,8 < 1776,5
	$r = -0,43$ (p < 0,05) (n = 171)	639,9 < 856,9 < 1107,1	787,1 < 946,8 < 1128,5
Ликвидаторы аварии	$r = -0,03$ (n = 115)	622,9 < 706,5 < 803,4	1059,5 < 1418,8 < 1815,8
	$r = -0,62$ (p < 0,05) (n = 205)	506,1 < 537,7 < 570,4	508,1 < 611,3 < 739,3

Примечание: в таблице представлены крайние (max и min) значения г.

Таблица 9. Сравнительный анализ содержания К и Zn в различных по уровню Са группах у здоровых лиц

Металл	Здоровые (n = 947)			
	Женщины (n = 709)		Мужчины (n = 238)	
	I группа (n = 437)	II группа (n = 272)	I группа (n = 149)	II группа (n = 89)
Са (мкг/г)	675,7 < 707,5 < 739	2494,6 < 2615,7 < 2746,6	318,5 < 335,4 < 351,3	888,1 < 1096,5 < 1408,2
К (мкг/г)	268,6 < 336,3 < 412,6	171,6 < 226,2 < 293,2	290,5 < 380,2 < 475,2	191,1 < 324,7 < 494,7
Zn (мкг/г)	171,3 < 176,2 < 181,1	196,4 < 205,6 < 215,1	154,5 < 162 < 168,8	190,2 < 205,3 < 220,3

Таблица 10. Сравнительный анализ содержания К и Zn в различных по уровню Са группах у ликвидаторов аварии

Металл	Ликвидаторы аварии (n = 954)			
	Женщины (n = 213)		Мужчины (n = 741)	
	I группа (n = 134)	II группа (n = 79)	I группа (n = 453)	II группа (n = 288)
Са (мкг/г)	477,6 < 505 < 739	1457,6 < 1634,7 < 1852,2	394,8 < 403,1 < 411,9	814,7 < 851,9 < 893,3
К (мкг/г)	285,6 < 357,2 < 439,3	159,9 < 216 < 281	424 < 468,8 < 512,6	291,9 < 346,3 < 404,1
Zn (мкг/г)	156,7 < 164,2 < 171,6	170,9 < 183,5 < 197,8	148,7 < 152,6 < 156,8	176,3 < 182,6 < 189,4

Примечание: в таблицах 8 и 9 группа I состоит из лиц, у которых индивидуальные значения Са не превышают нижней границы по интервальной оценке средней (bootstrap-метод); группа II — все остальные в данной выборке.

Как видно из таблиц 9 и 10, низкий уровень Са (группы I) сочетался с увеличением концентрации К и уменьшением — Zn (по сравнению с группами II). Причем в большинстве случаев достоверность различий удается подтвердить с помощью интервальной оценки средней.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нет сомнения, что выводы, которые могут быть сделаны на основании настоящих исследований, носят в значительной степени предварительный характер. Однако бесспорной нам кажется назревшая необходимость информации (дополнительной к количественному анализу) о событиях, которые реально происходят с металлолигандными комплексами. Эти события, получившие название металлолигандного гомеостаза, вряд ли могут быть правильно истолкованы без понимания роли самих лигандов в реализации известных биологических эффектов, которые традиционно приписывают исключительно металлам.

Анализ линейных корреляций между химическими элементами (по результатам спектрометрии) призван помочь в получении такой информации о МТ как наиболее распространенных белковых лигандах кадмия, меди и цинка. В этой связи представляется целесообразной количественная оценка МТ и/или апо-форм МТ — тионеинов (Т) в

том или ином биосубстрате (наряду с исследованием металлов).

Было установлено, что для связывания металлов в молекуле МТ существуют два домена α и β , имеющие существенные различия (Otvos, Armitage, 1980). Одно из таких различий — неодинаковые концевые остатки аминокислот в кластерах для связывания металлов. В α -домене, предназначенном, главным образом, для «токсичных» металлов (в частности, для Cd), концевые остатки представлены карбоксилем (carboxyl-terminal domain), а в β -домене — аминогруппой (amino-terminal domain). Именно из β -домена, который преимущественно связывает эссенциальные металлы (Zn, Cu), нитроксида удается избирательно высвободить Zn^{2+} за счет нитрозилирования тиолов (образования S-нитрозотиолов), оставляя незатронутым Cd-содержащий α -домен (Zangger et al., 2001).

Известны другие примеры функциональных взаимосвязей между МТ и NO. Оказалось, что они имеют ряд общих транзиттеров (ФНО α , ИЛ-1, липополисахариды) для запуска их внутриклеточного синтеза, и молекула МТ может служить ловушкой для агрессивных азотных радикалов. Кроме того, по мнению некоторых исследователей, высвобождающийся из металлотионеина Zn^{2+} способен ингибировать индуцибельную NO-синтазу (iNOS) и тем самым предотвращать гиперпродукцию NO в клетке (Zangger et al., 2001).

Высвобождение Zn^{2+} в значительной мере за счет редокс-статуса клетки, прооксидантные сдвиги в которой (например, накопление окисленного глутатиона — GSSG) помогают выходу Zn^{2+} из молекулы МТ, в то время как восстановленный глутатион (GSH), в отсутствие GSSG, тормозит этот процесс (Maret, 1995; Maret, Vallee, 1998). Таким образом, связь Zn с β -доменом МТ оказывается неустойчивой как в условиях окислительного, так и нитрозирующего стресса (Spahl et al., 2003; Malaiyandi et al., 2004).

Это обстоятельство имеет непосредственное отношение к ликвидаторам аварии на Чернобыльской АЭС, в редокс-статусе которых, как показали исследования (Kumegova et al., 2000), имеют место выраженные прооксидантные сдвиги: кратно превышающие норму показателя плазменной хемилюминесценции, достоверное снижение активности Se-зависимой глутатионпероксидазы эритроцитов (GSH-Px-I) и др. (см. табл. 7).

Нитрозирование тиолов нитроксидом в β -домене способно высвобождать не только Zn^{2+} , но и Cu^+ из Cu-содержащего МТ (Cu-MT). И если при этом Cu^+ связывается с апо-формой Cu, Zn-супероксиддисмутазы (apo-Zn-SOD), то Cu-MT может играть роль металлошаперона для одного из ключевых антиоксидантных ферментов клетки (Liu et al., 2000).

Эссенциальные металлы (Zn, Cu), освободившись от «уз» МТ с помощью азотных и кислородных радикалов, становятся перед выбором: остаться в эпидермальной клетке, чтобы помочь ей справиться с окислительным и нитрозирующим стрессом (например, в составе антиоксидантных ферментов и/или в качестве супрессора гиперпродукции NO), или покинуть ее. Последний выбор выглядит явно не в пользу эпидермальных клеток, однако именно он дает возможность сохранить для организма эссенциальные металлы, потребность в которых закономерно возрастает на фоне активизации радикальных процессов.

Абсолютно иной складывается ситуация в эпидермисе и его придатках для «токсичных» металлов и, в частности, для Cd. Будучи защищенными в α -домене МТ от release-эффекта азотных и кислородных радикалов, эти металлы могут, очевидно, не только остаться в клетке, но и, как показывают наши наблюдения (см. табл. 3), накапливаться в деривате эпидермиса (волосах). Что означают такие «накопления» для организма в целом?

Означают, что вся поверхность тела (у человека это около 2 м^2), покрытая волосами практически на всем протяжении (кроме ладоней и подошв), становится местом, где с постоянно отторгающимся эпидермисом и его дериватами организм избавляется от избытка тяжелых и/или «токсичных» металлов. Такая реакция кажется целесообразной и эволюционно оправданной и по праву может считаться компенсаторно-приспособительной не только при отравлении тяжелыми металлами, но

и при хроническом нарушении редокс-статуса организма — длительном прооксидантном сдвиге, который имеет место у ликвидаторов чернобыльской аварии.

В пользу такого представления свидетельствуют данные о достоверном повышении, по сравнению с нормой, уровня Zn и Cu в крови ликвидаторов аварии (Kumegova et al., 2000). Интересно, что кратное увеличение содержания Cu в крови чернобыльцев сочеталось с нормальным уровнем церулоплазмينا. К сожалению, в данной работе авторы не исследовали МТ плазмы.

Конкретные механизмы переноса металлов через плазматическую мембрану изучены недостаточно. Ведущая роль в этом процессе принадлежит довольно большому семейству АТФаз, состоящему из 5 подсемейств (I, II, III, IV и V). Наибольший интерес для нас представляет Р-тип (P-type) этих ферментов (и в первую очередь P_{1B} и P_{11}), так как именно АТФазы Р-типа обеспечивают трансмембранный трафик таких ионов, как H^+ , Na^+ , K^+ , Cu^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} и др. (Mandal et al., 2002; Arguello, 2003). Необходимую энергию для такого трафика, идущего против градиента концентрации, дает гидролиз АТФ. Считается, что нитрозирование S-содержащих белков в структуре K_{ATP} -каналов приводит в условиях нитрозирующего стресса к активации этих каналов (Kawano et al., 2009).

Нам кажется не случайным, что существование связи между ионными противотоками K^+ и Zn^{2+} (о чем можно судить по обнаруженной отрицательной K—Zn корреляции у чернобыльцев и частично среди здоровых лиц) сопровождается достоверным снижением концентрации Ca в эпидермальных клетках. Такое сочетание, как уже говорилось, может указывать (в качестве своеобразного дискриминатора) на активизацию в эпидермисе редокс-процессов с участием азотных и кислородных радикалов.

ВЫВОДЫ

1. Дериват эпидермиса (волосы) представляет собой удобный объект для неинвазивного и ретроспективного наблюдения за событиями в металлोलигандном гомеостазе эпидермальных клеток, пригодный для массовых (популяционных) исследований. Однако при количественном анализе минерального состава волос следует избегать обобщающих оценок в силу особой и еще недостаточно изученной роли, которую играет эпителий в поступлении и выведении металлов. Более того, нельзя исключить, что в большинстве случаев изменения концентрации металлов в эпидермисе могут носить перераспределительный характер и не соответствовать их истинному содержанию в организме.

2. Корреляционный анализ данных спектроскопии с последующей селекцией значимых кор-

реляций открывает новые возможности для изучения металлолигандного гомеостаза и его изменений, связанных с редокс-статусом организма (в частности, с окислительным и нитрозирующим стрессом).

3. Результаты настоящей работы позволяют предложить в качестве своеобразных дискриминаторов окислительного и нитрозирующего стресса следующие показатели: (а) увеличение в эпидермисе концентрационных значений К и Na наряду с уменьшением Са и Zn, (б) наличие значимой негативной К—Zn корреляции по данным спектрометрии волос.

ЛИТЕРАТУРА

- Петухов В.И., Дмитриев Е.В., Калвины И.Я., Баумане Л.Х., Шкестерс А.П., Скальный А.В. Корреляционный анализ в диагностике нарушений металлолигандного гомеостаза // Труды XVI Междунар. конф. и дискус. науч. клуба «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Ялта-Гурзуф, 2008. С. 254—255.
- Петухов В.И., Дмитриев Е.В., Шкестерс А.П., Скальный А.В. Проблемы интегральной оценки элементного статуса человека по данным спектрометрии волос // Микроэлементы в медицине. 2006. Т. 7, Вып. 4. С. 7—14.
- Северина И.С. Растворимая гуанилатциклаза в молекулярном механизме физиологических эффектов оксида азота // Биохимия. 1998. Т. 63, № 7. С. 939—947.
- Argiuello J.M. Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases // J Membrane Biol. 2003, 195:93—108.
- Bera A.K., Jarque C.M. Efficient tests for normality, homoscedasticity and serial independence of regression residuals // Economics Letters. 1980, 6(3):255—259.
- Cai L., Klein J.B., Kang Y.J. Metallothionein inhibits peroxynitrite-induced DNA and lipoprotein damage // J Biol Chem. 2000, 275:38957—38960.
- Davison A.C., Hinkley V.D. Bootstrap methods and their application. Cambridge University, UK, 1997. 582 p.
- Friedman R.L., Stark G.R. α -Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences // Nature. 1985, 314:637—639.
- Kang Y.J. Metallothionein redox cycle and function // Exp Biol Med. 2006, 231:1459—1467.
- Karin M., Imbra R.J., Heguy A., Wong G. Interleukin 1 regulates human metallothionein gene expression // Mol Cell Biol. 1985, 5:2866—2869.
- Kawano T., Zoga V., Kimura M., Liang M.Y., Wu H.E., Gemes G., McCallum J.B., Kwok W.M., Hogan Q.H., Sarantopoulos C.D. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation // Molecular Pain. 2009, 5:12.
- Kumerova A.O., Lece A.G., Skesters A.P., Orlikov G.A., Seleznev J.V., Rainsford K.D. Antioxidant defense and trace elements imbalance on patients with postradiation syndrome // Biol Trace Element Res. 2000, 77:1—12.
- Lilliefors H. On the Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unknown // Journal of the American Statistical Association 1967, 62(318):399—402.
- Liu S.-X., Fabisiak J.P., Tyurin V.A., Borisenko G.G., Pitt B.R., Lazo J.S., Kagan V.E. Reconstitution of apo-superoxide dismutase by nitric oxide-induced copper transfer from metallothionein // Chem Res Toxicol. 2000, 13:922—931.
- Lynes M.A., Borghesi L.A., Youn J., Olson E.A. Immunomodulatory activities of extracellular metallothionein. I. Metallothionein effects on antibody production // Toxicology. 1993, 85:161—177.
- Malaiyandi L.M., Dineley K.E., Reynolds I.J. Divergent consequences arise from metallothionein overexpression in astrocytes: zinc buffering and oxidant-induced zinc release // Glia. 2004, 45:346—353.
- Mandal A.K., Cheung W.D., Argiuello J.M. Characterization of thermophilic P-type Ag^+/Cu^+ -ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus* // J Biol Chem. 2002, 277(9):7201—7208.
- Maret W. Metallothionein/disulfide interactions, oxidative stress, and the mobilization of cellular zinc // Neurochem Int. 1995, 27:111—117.
- Maret W., Vallee B.L. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters // Proc Natl Acad Sci USA. 1998, 95:3478—3482.
- Margoshes M., Vallee B.L. A cadmium protein from equine kidney cortex // J Am Chem Soc. 1957, 79:4813—4814.
- O'Halloran T.V., Culotta V.C. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions // J Biol Chem. 2000, 275:25057—25060.
- Oliver J.R., Mara T.W., Cherian M.G. Impaired hepatic regeneration in metallothionein-I/II knockout mice after partial hepatectomy // Exp Biol Med. 2005, 230:61—67.
- Otvos J.D., Armitage I.M. Structure of metal clusters in rabbit liver metallothionein // Proc Natl Acad Sci USA. 1980, 77:7094—7098.
- Palmer R.D. The elusive function of metallothioneins // Proc Natl Acad Sci USA. 1988, 95:8428—8430.
- Palumaa P., Njankova O., Pokras L., Eriste E., Jörnvall H., Sillard R. Evidence for non-isostructural replacement of Zn^{2+} with Cd^{2+} in the β -domain of brain-specific metallothionein-3 // FEBS Letters. 2002, 527:76—80.
- Sato M., Sasaki M., Hojo H. Tissue specific induction of metallothionein synthesis by tumor necrosis factor- α // Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1992, 75:159—172.
- Sato M., Yamaki J., Hamaya M., Hojo H. Synergistic induction of metallothionein synthesis by interleukin-6, dexamethasone and zinc in rat // Int J Immunopharmacol. 1996, 18:167—172.
- Spahl D.U., Berendji-Grun D., Suschek C.V., Kolb-Bachofen V., Kroncke K.D. Regulation of zinc homeostasis by inducible NO synthase-derived NO: nuclear metallothionein translocation and intranuclear Zn^{2+} release // Proc Natl Acad Sci USA. 2003, 100:13952—13957.

West A.K., Chuah M.I., Vickers J.C., Chung R.S. Protective role of metallothionein in the injured mammalian brain // *Rev Neurosci* 2004, 15:157—166.

Youn J., Lynes M.A. Metallothionein-induced suppression of cytotoxic T lymphocyte function: an important immunoregulatory control // *Toxicol Sci.* 1999, 52:199—208.

Zangger K., Öz G., Haslinger E., Kunert O. and Armitage I.M. Nitric oxide selectively releases metals from the amino-terminal domain of metallothioneins: potential role at inflammatory sites // *The FASEB Journal.* 2001, 15:1303—1305.