

О. А. Кручиненко, Г. О. Ушакова
Дніпропетровський національний університет

ЗМІНА СТУПЕНЯ БОЛЮ ПІД ВПЛИВОМ МЕТАЛОТІОНЕЇНУ-II

Визначено вплив металотіонеїну-II на щурів в умовах післяопераційного соматогенного болю. Збудження глутаматних рецепторів є одним із головних механізмів відчуття болю. Отримані дані дають можливість припустити, що зниження післяопераційної гіпералгезії під впливом металотіонеїну-II пов'язане зі зв'язуванням іонів цинку, які потрібні для активації НМДА-рецепторів.

It was studied the effect of metallotionein-II to rats under postoperative somatogenic pain conditions. The main mechanism of pain is excitement of the glutamate receptors. The data obtained allow to suggest that decrease of postoperative hyperalgesia under metallotionein-II effect is connected with binding of the zink ions that stimulate NMDA-receptors.

Учені почали все більше звертати увагу на властивість цинку активувати НМДА (N-метил-D-аспартат) рецептори. НМДА-рецептори – це група іонотропних глутаматних рецепторів, котрі беруть участь у багатьох формах синаптичної трансмісії. Цинк взаємодіє з багатьма нетрансмітерними рецепторами, але гальмування НМДА-рецепторів особливо цікаве, бо дає можливість з'ясування ролі цинку, який здатен запасатися у синаптичних пухирцях. Він звільняється під час синаптичної активації і його концентрація в синаптичній щілині зростає до мікромолей [5].

У реалізації больового відчуття велику роль відіграють біохімічні фактори. Дослідження останніх років показали, що передача больової інформації від однієї нервової клітини до другої проходить за допомогою молекул нейропептидів. Припускають, що металотіонеїни беруть участь у збільшенні порога больової чутливості [3].

У пошуках компонента тканини, який відповідає за природну акумуляцію кадмію у нирках ссавців, у 1957 році Margashes та Vallee відкрили металотіонеїни (МТ) [12]. Це родина низькомолекулярних протеїнів, які локалізовані в цитоплазмі та ядрі. Складаються з 61–62 амінокислот; серед них цистеїн, серин, лізин, аргінін, аланін, валін, аспарагінова кислота, аспарагін, глютамінова кислота, глютамін, пролін, треонін, метіонін (не мають ароматичних амінокислот та гістидину). Цистеїнові залишки складають 25–30%. Молекулярна вага цих білків становить 6,5–7 кДа. У нативному стані білок не має дисульфідних зв'язків. Металотіонеїни виявляють чималий рівень поліморфізму. Притаманний винятковий ряд гомології, який свідчить про високу консервативність первинної структури. За допомогою метода полімеразної ланцюгової реакції була виділена послідовність гена МТТб. Цей ген складається з двох інтронів (575 bp та 602 bp) та трьох екзонів (22 bp, 77 bp, 78 bp) [10]. На сьогоднішній день відомі чотири ізоформи МТ: МТ-I, МТ-II – в епітеліальних тканинах (шкіра, слизова оболонка кишечника, печінка), МТ-III – у мозку, МТ-IV – в епітелії язика, шлунково-кишковому тракті.

Більше 17 підтипів МТ виділені за допомогою хроматографії, але тільки десять із них гіпотетично «функціонують» у людському організмі [3; 6].

Металотіонеїни мають великий рівень зв'язування з металами (7–10 $\frac{\text{г. атом}}{\text{моль}}$). Подальші експерименти показали, що цистеїнові залишки не є безпосередньо метал-зв'язуючими лігандами, а кожен іон металу вмонтований у тетраедричний комплекс чотирьох тіолових лігандів.

Досліди ЯМР-спектроскопії, зі зміненими відстанями метал-сірка, але такими ж кутами зв'язку над кадмієм, показали, що сім металів (Cd, Zn, Cu, Ag, Au, Hg, Pd), які були знайдені в МТ, зібрані у два кластери: 1) чотириатомний кластер А та 2) триатомний кластер В. Поява металу в кластері А супроводжується кооперативно появою в кластері В. Порядок звільнення від металу йде зворотнім шляхом. Коли зв'язується Cu, координаційна упаковка, мабуть, інша і тут залучається більше атомів на моль. Ця відмінність ще обговорюється.

Для розуміння механізму зв'язування металів металотіонеїном важливо знати точну структуру активного центра цього білка. Методами рентгенівської дифракції було виявлено, що Cd-Zn-металотіонеїн складається з двох глобул α та β . α -глобула має $\text{Me}_4\text{Cys}_{11}$ кластер, а β -глобула – Me_3Cys_9 кластер. В інших роботах методом ЯМР-спектроскопії була визначена тримірна структура всього білка з атомами Cd в активних центрах, а методом рентгенівської дифракції – структура Cd_5Zn_2 металотіонеїну [4].

Ці білки зв'язують атоми металів виключно в результаті створення зв'язків метал-сірка залишків цистеїну, що передбачає просторове зближення відповідних залишків цистеїну даного поліпептидного ланцюга у його нативній тримірній структурі. У дослідній структурі (металотіонеїну людини) мається 20 залишків цистеїну від усього числа амінокислотних залишків (61). Амінокислотні залишки цього білка створюють дві групи, які складаються з 9 та 11 залишків цистеїну кожна та зв'язують три або чотири атоми металу (Zn, Cd, Cu, Ag, Au, Hg, Pd) відповідно. Частина атомів сірки виступає в ролі спейсерів між тетраедрами з атомів сірки навколо кожного з атомів металу. За допомогою XANES-спектроскопії була отримана довжина зв'язку між атомами цинку та сірки металотіонеїну, котра становила 29 еВ при відстані між атомами цинку та сірки 2,50 ангстрем та 34 еВ – при відстані 2,35 ангстрем.

Будуючи просторову структуру металотіонеїну людини (без атомів металу), згідно з теорією Е. Г. Арутюняна та А. А. Замятніна, виявилось, що поліпептидний ланцюг дійсно формує два домени. Кожен з цих доменів має один кластер, який містить чотири та п'ять дисульфідних містків відповідно та по одному просторово зближеному з ними ізольованому залишку цистеїну. Межі доменів, конфігурації ланцюга (положення лінійних та нерегулярних її частин, поворотні ділянки) співпадають із результатами структурних дослідів [2].

Яким же чином проходить зв'язування металів, якщо більшість залишків цистеїну беруть участь у створенні S-S-мостиків? Була створена гіпотеза, яка, можливо, надалі підтвердиться. Унаслідок просторової зближеності залишків цистеїну, які беруть участь у формуванні різних дисульфідних містків, можливе альтернування S-S-зв'язків. Оскільки число SH-груп у кластерах непарне, завжди кожний кластер має вільну SH-групу, котра може каталізувати руйнування сусідніх дисульфідних містків. Таким чином, у кожний момент часу кожна з цих SH-груп може бути чи зайнятою, чи вільною. Останні можуть зв'язувати атоми металів.

Проведена нами експериментальна робота направлена на дослідження впливу МТ-II на шурів в умовах післяопераційного болю.

Матеріали та методи

Експериментальну частину роботи було проведено на 42 білих лабораторних щурах 2–3-місячного віку масою 180–220 г. Тварини знаходилися в стандартних умовах із циклічністю доби: світло – 12 годин, ніч – 12 годин.

Експериментальна модель післяопераційного болю була створена згідно з Бреннаном та співавторами [8]. На плантарній частині задньої правої кінцівки щура, анестезованого ефіром, після обробки шкіри розчином йоду та пеніциліну, проводився розріз шкіри, фасції та м'язів довжиною 10 мм. Після чого на рану накладали 2 шовкових шви. Рану повторно обробляли йодом. Експерименти проводили у відповідності до етичних принципів експериментальних досліджень на тваринах.

Оперованим тваринам вводили МТ-II в дозі 100 мкг/на тварину двічі на добу за два дні до операції та 100 мкг/на тварину двічі на добу протягом двох днів після операції. Усі препарати були введені інтраперитонеально. Щури були розділені на групи, по 5–6 тварин у кожній групі: 1 – контрольна, 2 – оперована (без застосування МТ-II), 3 – група з уведенням МТ-II до операції, 4 – із уведенням МТ-II після операції. Декапітацію тварин проводили через 24 години після операції (термін найгострішої гіпералгезії) та наприкінці сьомої доби (термін зниження гіпералгезії та заживлення рани). Для подальших досліджень використовували мозок та сироватку крові тварин.

Дослідження фізіологічної активності проводили за допомогою тестування у відкритому полі за Бурешом [1]. Усі тести проводили протягом однієї й тієї ж фази світлового циклу. Для формування груп були обрані щури зі схожою поведінковою активністю, виключаючи занадто активних та пасивних тварин. Тестування у відкритому полі дозволяє одночасно дослідити локомоторну, дослідницьку активність та емоційний стан тварин.

Після декапітації щурів для подальших досліджень були взяті довгастих мозок та таламус. Тканини головного мозку гомогенізували в 10 об'ємах буфера А (25 мМ трис-НСІ, рН=7,4; 1 мМ ЕДТО; 2 мМ 2-меркатоетанол; 0,2 мМ ФМСФ та 0,01% мертиолята) та центрифугували 60 хвилин при 50000g.

Кількісне визначення МТ-II у досліджуваних пробах проводили методом твердофазного конкурентного імуноферментного аналізу з використанням моноспецифічних поліклональних антитіл (Данія). Для побудови калібровки використовували чистий білок МТ-II (Sigma). Виміри оптичної густини проводили при 492 нм на рідері Anthos 2010. Загальну кількість білків у зразках визначали за методом Бредфорд [7]. Статистичну обробку результатів проводили з допомогою програми Statwin, використовуючи t-критерій Стюдента. Вірогідними вважали результати, якщо $p < 0,01$.

Результати та їх обговорення

Результати тестування щурів у «відкритому полі» показали, що післяопераційна гіпералгезія призводить до значної зміни поведінки дослідних щурів: знижуються показники кількості пройдених квадратів, перетнутих ліній (рухлива активність), кількість вертикальних положень (дослідницька активність), збільшуються акти дефекації (сомато-вегетативні реакції) (рис.1). При введенні МТ-II щурам до чи після операції визначається покращення стану тварин у післяопераційний термін, що свідчить про зменшення больового синдрому.

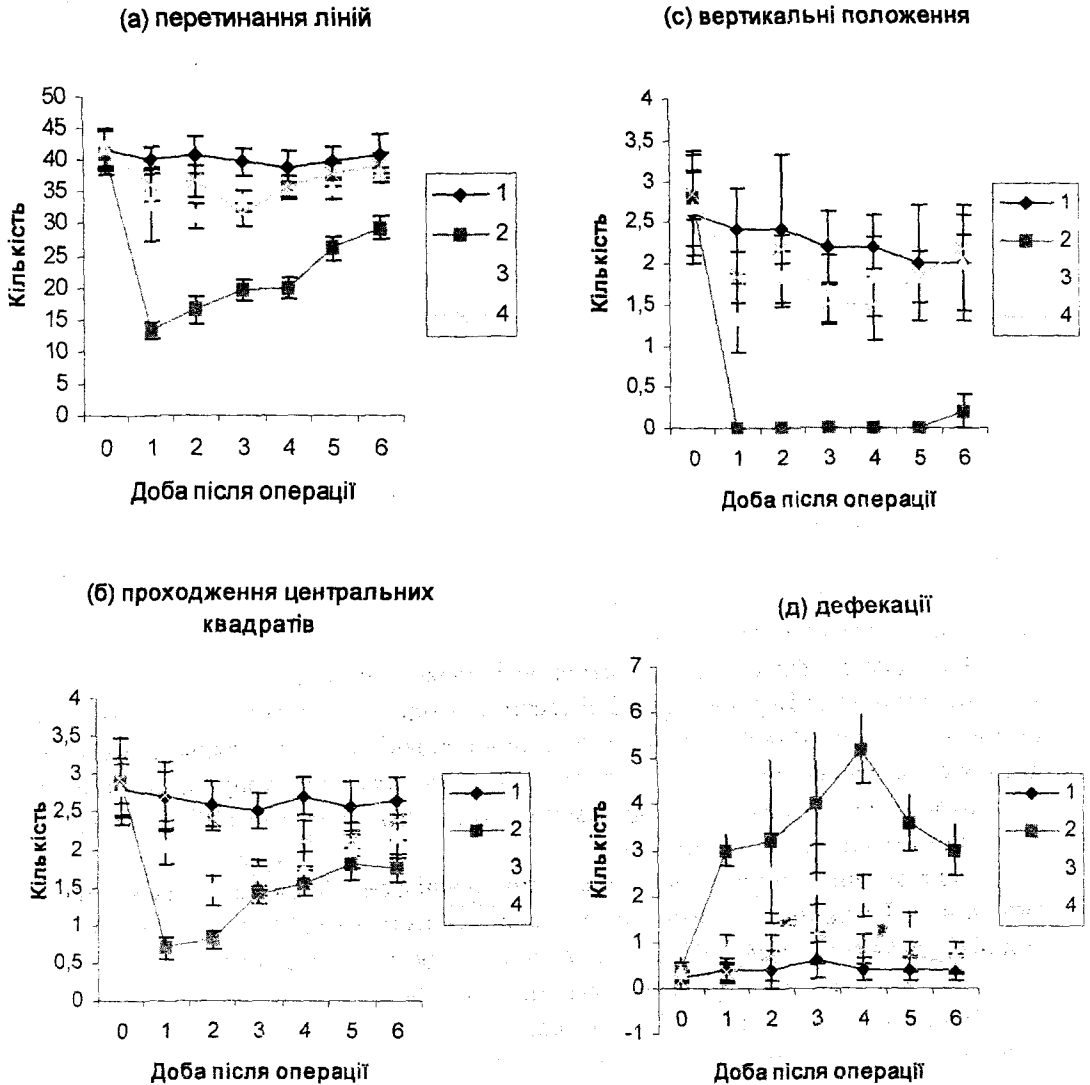


Рис. 1. Результати фізіологічних тестів щурів у «відкритому полі»:
0 – дні до операції, 1–6 – дні після операції: 1 – контроль; 2 – операція; 3 та 4 – ін'єкція 0,2 мл фізіологічного розчину з 100 мкг МТ-II на тварину двічі за добу протягом 2 днів до та після операції відповідно

Кращий ефект спостерігається при введенні МТ-II дозою 100 мкг/на тварину двічі за добу протягом двох днів після операції.

У відділах мозку (довгастий мозок, таламус) визначені дуже малі кількості МТ-II (0,01–0,025 мкг/мг загального білка) з великою розбіжністю результатів відносно кожної окремої тварини. Це можна пояснити двома причинами: 1) МТ-II не є головною ізоформою, притаманною мозку; 2) уведений МТ-II не проходить через існуючий гематоенцефалічний бар'єр.

Післяопераційний больовий синдром, викликаний порушеннями цілісності шкіри та фасції заднього м'яза у щурів, призводить до зниження вмісту МТ-II у сироватці крові оперованих щурів на фоні збільшення кількості загального білка.

Навіть на шосту добу після операції концентрація МТ-II у сироватці крові даних тварин була нижчою у 1,46 раза порівняно з контрольними щурами ($0,161 \pm 0,013$ та $0,11 \pm 0,024$ мкг/мл відповідно). Це свідчить про швидке його використання у тканинах організму в разі травми.

Ефекти дії металотіонеїнів були обрані для пошуку нових методів лікування експериментального аутоімунного енцефаломієліту, множинного склерозу. МТ-I та МТ-II можуть захищати клітини від активних форм кисню, пригнічувати апоптоз клітин у центральній нервовій системі, допомагати при формуванні гліальних рубців, протидіяти зменшенню маси тканини та судинному набряку, покращувати функціональний стан після фокальної церебральної ішемії [9; 11].

Отримані нами дані свідчать про зниження відчуття болю у післяопераційний термін за участю МТ-II. Цей феномен, можливо, пов'язаний із регуляцією концентрації іонів цинку, що впливають на активацію НМДА-рецепторів і специфічно зв'язуються цим білком.

Бібліографічні посилання

1. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. Хьюстон. – М.: Высшая школа, 1991. – С. 119–122.
2. Замятнин А. А. Протоколы испытаний теории нового кода. – М., 1999. – С. 28–36.
3. Касиль Г. Н. Боль и обезболивание. – М.: Наука, 1965. – С. 55–57.
4. Смоленцев Г. Ю. Определение геометрии активных центров тионеина с помощью XANES спектроскопии // Биофизика. – Ростов. – 2000. – № 4. – С. 14–16.
5. Удріс Г. А. Биологическая роль цинка / Г. А. Удріс, Н. Г. Нейланд. – Рига, 1981. – С. 31–33.
6. Alan B. G. Metallotioneins potential therapeutic aids for wound healing in the skin // Wound Healing Society. – 2002. – Vol. 31. – P. 130–132.
7. Bradford M. Rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1985. – Vol. 72. – P. 248–254.
8. Brennan T. J. Characterization of a rat model of incisional pain / T. J. Brennan, E. P. Vandermeulen, G. F. Gebhart. // Pain. – 1996. – Vol. 64, № 3. – P. 493–521.
9. Giralt M. Metallotionein I+II protect the CNS after a focal brain injury / M. Giralt, M. Penkova, N. Lago // Experimental Neurology. – 2002. – Vol. 173. – P. 114–128.
10. Li B. Cloning of metallotionein cDNAs and its gene in shore crab (*Carcinus maenas*) / B. Li, D. Savva // PubMed. – 2000. – Vol. 32, № 6. – P. 640–644.
11. Penkova M. Metallotionein I+II expresion and their role in experimental autoimmune encefalomyelities / M. Penkova, J. Hidalgo // Glia. – 2000. – Vol. 32. – P. 247–263.
12. Protein deficiency and Autism // Vitamin and Nutritional Research. – 2004. – P. 10–20.

Надійшла до редколегії 25.01.05