ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫХ МЕТАЛЛОВ С АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНОМ И ДРУГИМИ БЕЛКАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

В. Н. Зорина ✉, Е. А. Евдокимова, В. Л. Рейнюк

Научно-клинический центр токсикологии имени С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Гомеостаз металлов играет важную роль в жизнедеятельности организма. При этом имеет значение не только концентрация токсичных и эссенциальных металлов в биологических жидкостях, но и их способность взаимодействовать с белками и ферментами, определяющая активность последних. Целью работы было сравнить возможности связывания различных ионов металлов с белками сыворотки крови человека. Изучение реакций иммобилизованных ионов металлов (Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+}, Mg^{2+}, Hg^{+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cr^{3+}, Co^{2+}, Ag^{+}, Bi^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}) с белками крови, а также с высокоочищенным металлопротеином крови (альфа-2-макроглобулин, а2-МГ) проводили методом перекрестного иммуноэлектрофореза с адсорбцией *in situ* во втором направлении. Показано, что в реакциях *in vitro* ионы Hg^{+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} активнее других взаимодействуют с металлопротеинами (в частности с а2-МГ) и со многими другими белками крови человека. Продемонстрировано, что а2-МГ взаимодействует не только с ионами Zn^{2+} и Cd^{2+}, как описано ранее, но и с Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Pb^{2+}, Sr^{2}, Ag^{+}. Выявлено взаимодействие ряда ионов металлов, в том числе высокотоксичных, с белками крови, не являющимися металлопротеинами. Результаты подтверждают принципиальную возможность активного участия дисбаланса ионов металлов в обменных нарушениях через воздействие на регуляторные и транспортные белки организма, что требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: ионы металлов, металлопротеины, альфа-2-макроглобулин, иммуноэлектрофорез, интоксикация

Благодарности: профессору Н. А. Зорину за разработку вариантов метода перекрестного иммуноэлектрофореза с адсорбцией *in situ* во втором направлении и метода выделения высокоочищенного препарата а2-МГ, а также за предоставление образцов антисывороток.

Вклад авторов: В. Н. Зорина — планирование и проведение исследования, анализ литературы, написание статьи; Е. А. Евдокимова — нормоконтроль, составление списка литературы; В. Л. Рейнюк — редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Вероника Николаевна Зорина
ул. Бехтерева, д. 1, г. Санкт-Петербург, 192019, Россия; nilimmun@yandex.ru

Статья получена: 16.03.2023 **Статья принята к печати:** 07.04.2023 **Опубликована онлайн:** 18.05.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.011

ASSESSING THE POSSIBILITY OF INTERACTIONS OF VARIOUS METALS WITH ALPHA-2-MACROGLOBULIN AND OTHER HUMAN BLOOD PROTEINS *IN VITRO*

Zorina VN ✉, Evdokimova EA, Rejniuk VL

Golikov Research Clinical Center of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency, Saint-Petersburg, Russia

Homeostasis of metals plays an important role in functioning of the body. Not only the concentrations of toxic and essential metals in bodily fluids, but also their ability of interaction with proteins and enzymes defining the enzyme activity, are important. The study was aimed to compare the possibilities of binding interactions between various metal ions and human serum proteins. Chemical reactions between the immobilized metal ions (Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{3+}, Mg^{2+}, Hg^{+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cr^{3+}, Co^{2+}, Ag^{+}, Bi^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}) and the serum proteins or highly purified blood metalloprotein (alpha-2-macroglobulin, α2M) were assessed by the crossed immunoelectrophoresis with *in situ* adsorption in the second dimension. It has been shown that Hg^{+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} ions more actively interact with metalloproteins (particularly, with α2M) and many other human blood proteins in *in vitro* reactions than other ions. We have demonstrated that α2M interacts not only with Zn^{2+} and Cd^{2+} ions, as earlier reported, but also with Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Pb^{2+}, Sr^{2}, Ag^{+}. Interaction of a number of metal ions, including highly toxic ones, with blood proteins that are not metalloproteins has been revealed. The findings confirm the fundamental possibility of the metal ion imbalance active involvement in metabolic disorders via effects on the body's regulatory and transport proteins, which requires further investigation

Keywords: metal ions, metalloproteins, alpha-2-macroglobulin, immunoelectrophoresis, intoxication

Acknowledgements: the authors would like to thank Professor N.A. Zorin for developing the variants of the crossed immunoelectrophoresis with in situ adsorption in the second dimension and the method for extraction of the highly purified α2M preparation, as well as for providing the antisera samples.

Author contribution: Zorina VN — planning and conducting the study, literature review, manuscript writing; Evdokimova EA — compliance check, compilation of reference list; Rejniuk VL — manuscript editing.

Compliance with ethical standards: the study was carried out in accordance with the principles stated in the Declaration of Helsinki of the World Medical Association.

✉ **Correspondence should be addressed:** Veronika N. Zorina
Bekhtereva, 1, Saint-Petersburg, 192019, Russia; nilimmun@yandex.ru

Received: 16.03.2023 **Accepted:** 07.04.2023 **Published online:** 18.05.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.011

Ионы металлов играют важную роль в обменных процессах живых систем, от переноса электронов и реакций биокатализа до формирования третичной структуры металлопротеинов, определяющей их биологическую активность. Нарушение гомеостаза эссенциальных металлов ассоциировано с функциональными нарушениями и тяжелыми патологическими состояниями. Известно, что превышение физиологичных уровней Fe, Mn, Cu, Zn вызывает проявления нейротоксичности, избыток Zn и Cu провоцирует токсическое поражение почек и печени, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, угнетение функции иммунной и центральной нервной систем [1]. Значительное количество металлов обнаруживают в бляшках, тельцах Леви и включениях в

цитоплазму клеток при нейродегенеративных заболеваниях (болезни Альцгеймера, Паркинсона и др.), а также при боковом амиотрофическом склерозе [2]. При этом ионы Zn обладают и антиатерогенными свойствами [3]. Дефицит эссенциальных металлов тоже оказывает негативное влияние на организм, в частности ионы Zn незаменимы для реализации функций ферментов (алкогольдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, карбоангидразы, лейцинаминопептидазы и супероксиддисмутазы), дефицит Zn провоцирует развитие дерматозов, анорексии, задержек роста, наблюдается при плохом заживлении ран и нарушениях репродуктивной функции [1]. Роль металлов с переменной валентностью может быть и позитивной и негативной — ионы Mn способствуют генерации гидроксильного радикала и одновременно являются кофакторами ферментов антиоксидантной защиты при развитии атеросклеротических процессов [3].

Крайне важно учитывать реакции металлов друг с другом, в том числе в составе органических соединений, ферментов и белков, при оценке их воздействия на организм. В частности, Pb, Hg, Cd высокотоксичны и вызывают тяжелые интоксикации при попадании в организм [4], селеноорганические соединения демонстрируют антиоксидантную и антитоксическую активность при отравлении солями тяжелых металлов [5]. В целом около трети белков сыворотки крови содержат ионы металлов в своем составе [2]. Наибольший интерес представляет изучение металлопротеинов с регуляторными и транспортными функциями, способных оказывать опосредованное воздействие на целый ряд органов и систем организма за счет изменений ионного состава. В частности, альфа-2-макроглобулин (а2-МГ) человека содержит в своей структуре четыре иона Zn. При этом концентрация данного белка достаточно высока (2–3 г/л), а функции разнообразны: ингибирование протеиназ широкого профиля; транспортирование и регуляция синтеза цитокинов, гормонов и фактора роста; регуляция апоптоза клеток, синаптогенеза, роста и пролиферации нейронов; регуляция концентрации дофамина в дофаминэргических нейронах и синтеза ацетилхолинтрансферазы [6].

При изучении роли ионов металлов в физиологических процессах немаловажно учитывать их распределение в тканях и биожидкостях. В частности, ионы Ag, Ca, Cu, In, Li, Na, Se, Si, Sr обнаруживают преимущественно в плазме крови человека, а Fe, K, Mn, Ni, V, Zn — в кровяных тельцах. С увеличением ионного радиуса распределение тяжелых металлов смещается из клеток в плазму крови, а распределение щелочных металлов — наоборот, в клетки [7]. Соответственно, для изучения общего содержания металлов в организме предпочтительно использовать метод масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС), позволяющий определять значительное количество металлов, в том числе в минорных концентрациях. Однако для изучения взаимодействия с белками необходимо применять другие методы: кристаллографию, ядерный магнитный резонанс, электронный парамагнитный резонанс, методики с применением флуоресценции, спектрометрические методы, а также поверхностный плазмонный резонанс [2]. Подавляющее большинство вышеперечисленных методов связано с частичной или полной денатурацией белка и малоприменимо для анализа смесей, что осложняет получение объективных научных данных о процессах, происходящих в живом организме. Перспективными представляются менее чувствительные, но более щадящие методы с хорошим потенциалом сравнительной визуализации результатов, например, варианты метода перекрестного иммуноэлектрофореза.

Целью исследования было сравнить возможности связывания различных ионов металлов с белками сыворотки крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали сливную сыворотку крови (от 40 практически здоровых доноров обоего пола 20–40 лет для выявления всех возможных взаимодействий) и сливную плазму крови здоровых доноров.

Высокоочищенные препараты а2-МГ были получены из плазмы крови сочетанием дробного осаждения ПЭГ-6000, анионообменной хроматографии и цинк-хелатной хроматографии [8].

Поликлональные кроличьи антисыворотки против всех белков крови человека и против а2-МГ человека были получены путем внутрикожной иммунизации двух групп кроликов (сывороткой крови и высокоочищенным препаратом а2-МГ соответственно).

Для изучения возможности связывания белков сыворотки крови человека с ионами металлов использовали перекрестный вариант иммуноэлектрофореза с адсорбцией *in situ* во втором направлении. Горизонтальный иммуноэлектрофорез осуществляли в пластинах агарозного геля на стеклянной подложке. Для этого использовали агарозу типа 1 (Sigma; США) в виде 1%-го золя в трис-трициновом буфере pH 8,6 [9]. В сформированном слое геля толщиной 1 мм вырезали круглые лунки, в них вносили по 5 мкл сыворотки крови или препарата а2-МГ. Электрофорез в первом направлении проводили в течение 1 ч при 200 В. После этого гель разрезали на полосы шириной 10 мм, которые перемещали на край стеклянных пластин-подложек. Свободное пространство заливали 1%-м золем агарозы.

После образования геля вырезали карман шириной 0,5 см, отступив около 2 мм от границы с гелем первого направления электрофореза. Освобожденный от агарозы карман заполняли гелем с иммобилизованными на сорбенте эссенциальными, условно-эссенциальными и токсичными металлами из состава солей (табл. 1).

Для получения геля образец имминодиуксуснокислой (ИДК) агарозы (Sigma; США) помещали в хроматографическую колонку и последовательно промывали десятью объемами следующих препаратов: 1) 0,05 М динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты; 2) бидистилированной водой; 3) 0,05 М водного раствора тестируемого металла; 4) бидистилированной водой; 5) трис-трициновым буфером pH 8,6.

После заполнения кармана гелем с иммобилизованным металлом агарозный гель над ним обрезали на расстоянии 2 мм от края кармана и заполняли освободившееся пространство 1%-м золем агарозы, содержащей 5% соответствующей антисыворотки. Иммуноэлектрофорез во втором направлении проводили в течение 18 ч при 100 В. По завершении электрофореза пластины геля отмывали 24 ч 0,1 М раствором NaCl, высушивали и окрашивали кумаси бриллиантовым синим R-250.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно полученным данным, при изучении образца сливной сыворотки здоровых доноров (рис. 1) белки

Таблица 1. Перечень веществ, использованных для иммобилизации металлов

№	образец	№	образец	№	образец	№	образец
1	контроль (без металлов)	2	$CuSO_4$	3	$CdSO_4 \times 3\ H_2O$	4	$AgNO_3$
5	$Zn(CH_3COO)_2 \times 2\ H_2O$	6	$FeCl_3 \times 6\ H_2O$	7	$Pb(CH_3COO)_2$	8	$Bi(NO_3) \times 5\ H_2O$
9	$MnCl_2 \times 4\ H_2O$	10	$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	11	$Sr(NO_3)_2$	12	$Ba(CH_3COO)_2$
13	$CrCl_3$	14	$CaCl_2 \times 6\ H_2O$	15	$MgCl_2 \times 6\ H_2O$	16	$Hg(NO_3) \times 1/2\ H_2O$

крови связываются не только с эссенциальными, но и с токсичными металлами в составе промежуточного геля с соответствующим уменьшением площади преципитата на электрофореграмме.

В частности, активное связывание многих белков сыворотки крови отмечено при наличии не только ионов Zn^{2+} и Cu^{2+}, а также Cd^{2+}, но и Hg^{+} в составе промежуточного геля.

Умеренное связывание с белками сыворотки крови обнаружено в электрофореграммах, содержащих не только Sr^{2+} и Pb^{2+}, но и Ba^{2+} в составе промежуточного геля. При этом Sr^{2+} активно связывался с гликопротеинами сыворотки крови.

Отмечен слабовыраженный аффинитет отдельных белков сыворотки крови не только к ионам Fe^{3+}, Mn^{2+}, но и к ионам Ag^{+}. Продемонстрировано слабовыраженное связывание отдельных белков с ионами Ca^{2+} и Bi^{2+}.

Выявлена низкая активность связывания ионов Mg^{2+} с гамма-глобулинами. Отдельные белки слабо взаимодействовали с ионами Co^{2+}. При оценке взаимодействия с ионами Cr^{3+} реакция практически отсутствовала.

При изучении возможности связывания молекул а2-МГ в составе высокоочищенного монопрепарата с ионами металлов (рис. 2) выявлено, что данный металлопротеин, являющийся также гликопротеином, активно взаимодействует не только с Zn^{2+} в составе промежуточного геля, но и с ионами Cd^{2+} (зафиксировано уменьшение высоты пика более чем на 50% от исходного уровня). В случае включения не только ионов Fe^{3+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, но и Pb^{2+}, Sr^{2+}, а также Ag^{+} в промежуточный гель, высота пика составляла 50–60% от высоты пика на электрофореграме в контрольном образце.

При включении иммобилизованных ионов Cu^{2+}, а также Hg^{+}, Ba^{2+}, Bi^{2+}, уменьшение высоты пика на электрофореграмме составляло 40% и более, что свидетельствует о достаточно активном взаимодействии данных металлов с молекулой а2-МГ в условиях *in vitro*.

При включении в промежуточный гель ионов Cr^{3+} и Co^{2+} связывание с а2-МГ было минимальным, уменьшение высоты пика составляло не более 10% в сравнении с контрольным образцом.

Полуколичественные данные по активности связывания белков крови и а2-МГ с ионами металлов в составе промежуточного геля представлены в табл. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

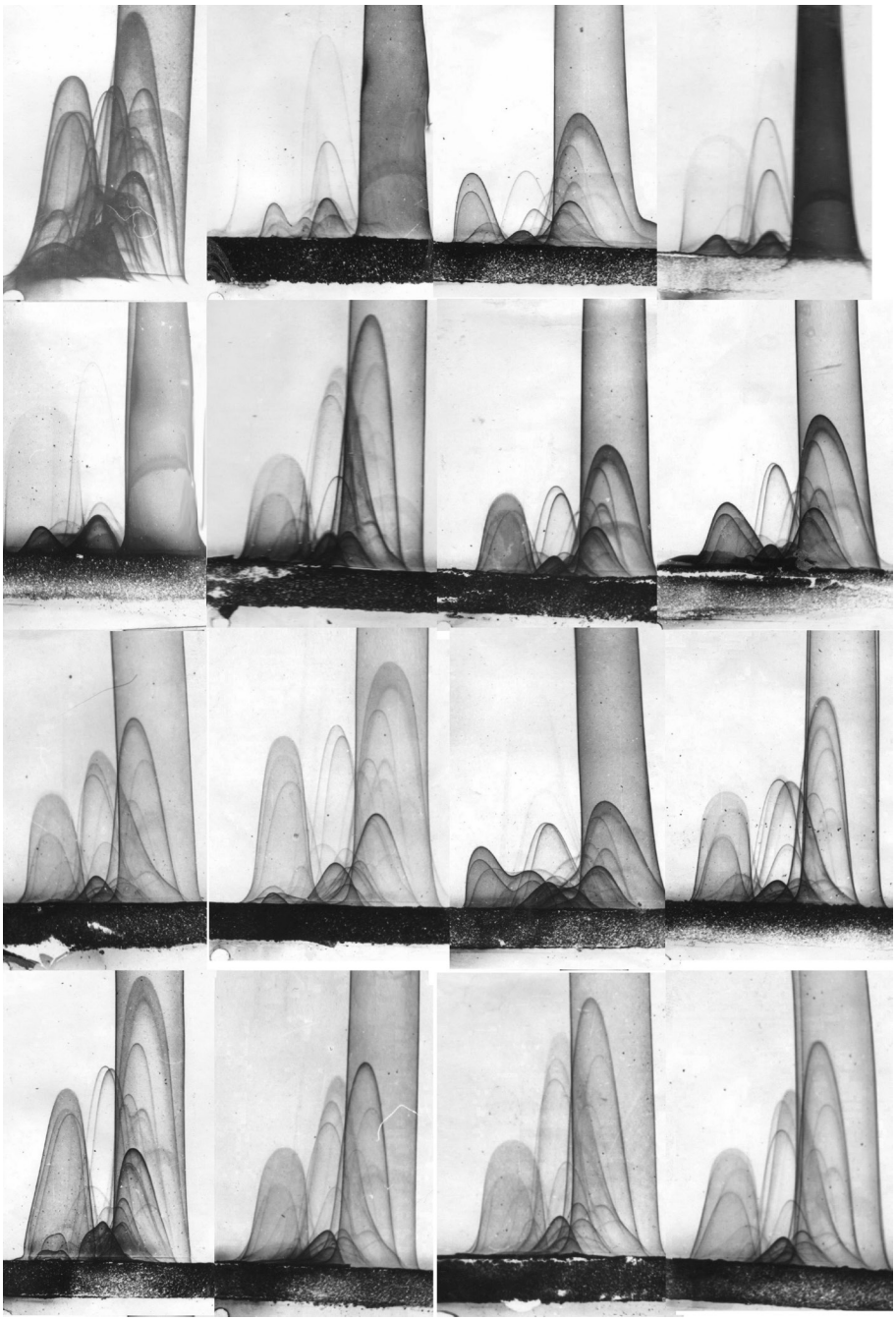
Проведенное исследование продемонстрировало, что белки сыворотки крови могут связываться с иммобилизованными металлами, даже если не являются металлопротеинами.

Принципиальная возможность связывания белков без образования металлхелатных связей известна, однако ранее методом сочетания гель-фильтрационной хроматографии в сочетании с атомно-эмиссионной спектрометрией с индуктивно связанной плазмой (АСП-МС) было идентифицировано только связывание с эссенциальными металлами — два белка взаимодействовали с цинком (альфа-2-макроглобулин и альбумин), два белка связывались с железом (ферритин и трансферрин) и четыре белка связывались с медью (церулоплазмин, альбумин, фактор V, транскупреин) [10]. По результатам других авторов, сочетание аффинной хроматографии (иммобилизованный металл в составе сорбента) и ЖХ-МС/МС позволило продемонстрировать, что С3 компонент комплемента, а2-МГ, отдельные изоформы альбумина, аполипопротеины, церулоплазмин, серотрансферрин, кератин, γ-глобулины могут взаимодействовать не только с эссенциальными Cu^{2+}, Zn^{2+}, но и с условно-эссенциальными Cd^{2+}, Pb^{2+} [1, 11].

Согласно полученным нами данным, спектр белков крови, способных взаимодействовать с ионами металлов, еще шире и включает взаимодействие с макроэлементами (Ca^{2+}, Mg^{2+}) и токсичными микроэлементами (Ag^{+}, Hg^{+}, Ba^{2+}, Bi^{2+}).

Таблица 2. Аффинитет белков сыворотки крови человека к изученным ионам металлов в составе промежуточного геля при иммуноэлектрофорезе

Объект	Степень сродства	Ионы макроэлементов и эссенциальных микроэлементов	Ионы условно-эссенциальных микроэлементов	Ионы токсичных микроэлементов
Все белки сыворотки крови	+++ (высокое)	Cu^{2+}, Zn^{2+}	Cd^{2+}	Hg^{+}
	++ (среднее)		Pb^{2+}, Sr^{2+}	Ba^{2+}
	+ (слабое)	Ca^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}		Ag^{+}, Bi^{2+}
	+/– (низкое)	Mg^{2+}, Cr^{3+}, Co^{2+}		
Альфа-2-макроглобулин	+++ (≥ 50%)	Zn^{2+}	Cd^{2+}	
	++ (≥ 40%)	Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}	Pb^{2+}, Sr^{2+}	Ag^{+},
	+ (≥ 30%)	Cu^{2+}		Hg^{+}, Ba^{2+}, Bi^{2+}
	+/– (< 10%)	Cr^{3+}, Co^{2+}		



Контроль	Cu^{2+}	Cd^{2+}	Ag^{+}
Zn^{2+}	Fe^{3+}	Pb^{2+}	Bi^{2+}
Mn^{2+}	Co^{2+}	Sr^{2+}	Ba^{2+}
Cr^{3+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Hg^{+}

Рис. 1. Взаимодействие иммобилизованных ионов металлов с белками сыворотки крови. Снижение высоты и площади пика свидетельствует о реакции белка с металлом в составе промежуточного геля. Схема расположения металлов в образцах — в таблице под рисунком

Безусловно, результаты исследования *in vitro* требуют дополнительного подтверждения в условиях *in vivo*, однако можно предположить, что токсичность металлов может реализовываться и через конкурентные взаимодействия с эссенциальными металлами в составе белков, и через образование связей металл–металл, не отличающихся большой прочностью, но способных, как и в случае вытеснения эссенциального микроэлемента по конкурентному типу, негативно повлиять на конформационную структуру белка, его сродство к рецепторам и лигандам. Механизмы и биологические последствия подобных реакций при острой и хронической интоксикации металлами требуют дальнейшего изучения.

Согласно полученным результатам, высоким аффинитетом (на известном уровне допущений, с учетом выявленных взаимодействий и ныне известных свойств) к широкому спектру белков сыворотки обладают не только ионы эссенциальных микроэлементов (Cu^{2+}, Zn^{2+}), как подробно описано ранее при изучении белковой фракции γ-глобулинов человека и оппозитных

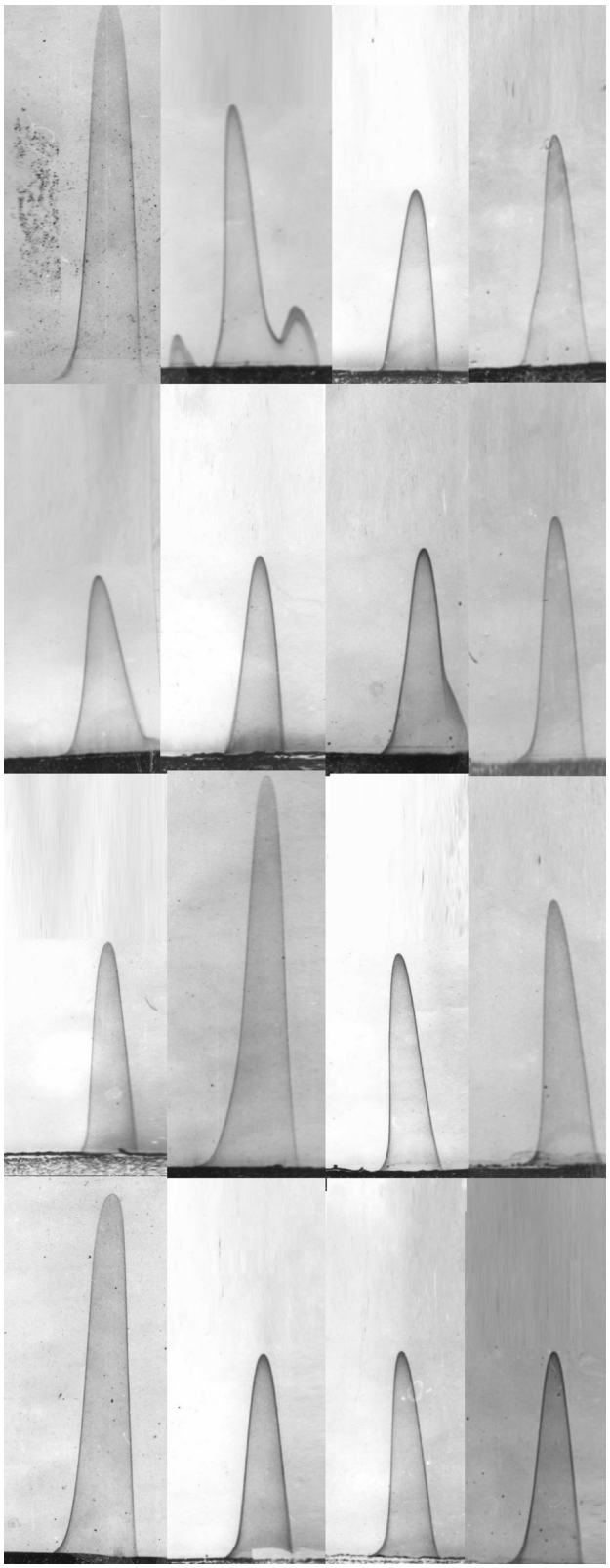
эффектов меди и цинка [11] и относимого к условно-эссенциальным Cd^{2+}, но и ионы Hg^{+}. Известно, что многие соединения кадмия токсичны. Важнейшими мишенями для Cd^{2+} являются тиоловые группы (–SH) цистеинов, присутствующих в белках, кадмий может подавлять активность многих митохондриальных ферментов [12]. Можно предположить, что при возникновении конкурентных или других взаимодействий ионов кадмия с регуляторными и транспортными металлопротеинами или ферментами, содержащими ионы Zn^{2+} и особенно менее реакционноспособные ионы Fe^{3+} Cu^{2+}, Mg^{2+} в своей структуре, могут существенно изменять свойства белков, блокировать исходные функции и даже проявлять новые свойства (например, иммуногенность). Не зря при лечении отравлений кадмием в числе прочего рекомендовано введение альбумина, также являющегося цинк-содержащим металлопротеином.

Токсичность ртути общеизвестна. В числе прочего, она конкурирует за сайты связывания металлов (цинка, меди и других) в составе металлопротеинов, подавляя их активность, а также активно и высокоаффинно взаимодействует с тиоловыми, карбоксильными и другими ферментами (АТФазой, холинэстеразой, щелочной фосфатазой, глутатионпероксидазой, глутаминсинтетазой и др.) [5, 13]. Наши результаты демонстрируют, что ионы ртути способны взаимодействовать и с другими белками. Биологические последствия подобных взаимодействий требуют дальнейшего изучения.

Обращает также на себя внимание достаточно высокая реакционноспособность ионов бария и свинца по отношению к различным белкам сыворотки крови человека. Несмотря на то что свинец относят к условно-эссенциальным микроэлементам, значительная часть его соединений (особенно воднорастворимых) токсична. Известно, что механизм токсического действия свинца связан с блокированием тиоловых ферментов взаимодействием с карбоксильными и фосфатными группами биополимеров, инактивацией эстераз [14]. Полученные нами результаты наглядно продемонстрировали наличие подобных взаимодействий с белками крови человека.

Несмотря на то что медь является эссенциальным микроэлементом, избыток и депривация меди имеют крайне неблагоприятные последствия для организма, с нарушениями гомеостаза меди связан патогенез различных нейродегенеративных заболеваний [4]. Ранее продемонстрировано, что Cu^{2+} обладает свойствами редокс-активного металла, реализующего мощный окислительный потенциал в биологических системах. Хелатирование Cu^{2+} может вызывать частичное расщепление боковых аминокислотных радикалов, сахаров и сиаловых кислот на поверхности макромолекулы, а также деструктурирование пространственной упаковки поверхностного слоя, включая антигенные детерминанты [11]. Выявленный широкий спектр белков, взаимодействующих с ионами меди, обосновывает необходимость их дальнейшей идентификации для уточнения их возможной роли в патогенезе различных заболеваний.

В качестве «модельного» белка для сравнительной оценки возможности связывания с ионами металлов был выбран а2-МГ. В работе использовали нативную форму белка, полученную щадящими методами препаративной хроматографии низкого давления, что приближает полученные результаты к реальным процессам, происходящим в организме человека.



Контроль	Cu^{2+}	Cd^{2+}	Ag^{+}
Zn^{2+}	Fe^{3+}	Pb^{2+}	Bi^{2+}
Mn^{2+}	Co^{2+}	Sr^{2+}	Ba^{2+}
Cr^{3+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Hg^{+}

Рис. 2. Взаимодействие иммобилизованных ионов металлов с альфа-2-макроглобулином из сыворотки крови. Снижение высоты и площади пика свидетельствует о реакции белка с металлом в составе промежуточного геля. Схема расположения металлов в образцах — в таблице под рисунком

Наиболее активное взаимодействие можно наблюдать между а2-МГ с ионами Zn^{2+} и Cd^{2+}. Этот результат совпадает с результатами об образовании взаимосвязей а2-МГ с Cd^{2+}, Zn^{2+} и, в меньшей степени, с Ni^{2+} и Pb^{2+}, полученными ранее другими методами [1]. Известно, что цинк является структурообразующим компонентом а2-МГ, каждая из четырех субъединиц а2-МГ включает в себя один ион цинка. Ранее установлено, что кадмий, взаимодействуя с цинком в составе а2-МГ, разрушает хелатную связь между полумолекулами, белок разделяется надвое и лишается большей части регуляторных функций. Поскольку а2-МГ задействован в регуляции цитокинового профиля, липидного обмена, ингибировании широкого спектра протеиназ, проведении сигнала по нервной системе, воспалительных и аутоиммунных реакциях организма [6], интоксикация кадмием может приводить к массированному срыву регуляторных процессов, осуществляемых данным белком, а наличие такого взаимодействия, в свою очередь, объясняет некоторые механизмы токсичности кадмия.

Более того, нарушения метаболизма цинка играют ключевую роль в механизмах старения, отдельные авторы рекомендуют использование цинка как добавки к пище для увеличения продолжительности жизни [15]. Очевидно, что конкурирующий за связывание с а2-МГ кадмий оказывает прямо противоположный эффект. В отличие от ионов цинка в составе белков, избыточная концентрация свободного цинка в крови оказывает нейротоксическое действие [4], что может быть одним из компонентов ускоренного старения организма при хронической интоксикации металлами, а также одним из компонентов патогенеза сенильной деменции.

Немаловажно и выявленное взаимодействие а2-МГ со свинцом. Ранее показано, что свинец способен взаимодействовать с активными центрами ряда ферментов (АТФазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы и др.) [16]. Известно, что а2-МГ является универсальным ингибитором протеиназ, однако в данном случае мы наблюдаем не опосредованное, а прямое воздействие Pb^{2+} на данный ингибитор ферментов. Можно предположить, что при интоксикации свинцом в крови циркулируют не только фосфаты и альбуминаты свинца [14], но и его комплексы с а2-МГ. Учитывая гепатотоксичность свинца, негативное влияние на а2-МГ идет с двух сторон: гибель синтезирующих а2-МГ гепатоцитов и блокирование функций самого а2-МГ за счет взаимодействия с ионами свинца.

Выявленная способность а2-МГ взаимодействовать с ионами марганца также может негативно влиять на функции данного регуляторно-транспортного белка. Известно, что избыток марганца нарушает каталитические свойства ферментов, восстановленная форма (Mn^{3+}) способствует развитию окислительного стресса [17]. В данном случае негативное воздействие этого эссенциального микроэлемента на а2-МГ может быть реализовано при помощи двух механизмов — как изменение функций самого белка за счет конкурентного взаимодействия, с вытеснением цинка, так и повреждение молекулы а2-МГ супероксидными радикалами. Известно, что у «окисленной» формы а2-МГ нарушена способность к утилизации (снижено сродство к рецепторам) [6] и она становится потенциально иммуногенной за счет изменения конформации.

О влиянии дисбаланса микроэлементов на физиологические и патологические процессы, реализуемые при участии регуляторно-транспортных белков, косвенно свидетельствует и описанное ранее усиление ингибирования в крови активированного протеина С (APC) с участием а2-МГ под воздействием ионов двухвалентных металлов (Zn, Mn, Cu) [18]. Согласно полученным результатам, причиной данного феномена может быть прямое воздействие эссенциальных микроэлементов на а2-МГ и его функции в организме.

Выявленная способность а2-МГ достаточно активно взаимодействовать с макроэлементами (магнием, кальцием, железом) требует дополнительного изучения влияния образования подобных связей на физиологические и патологические процессы.

Обращает на себя внимание тот факт, что значительная часть клинических проявлений при острой интоксикации металлами проявляется, пусть и в менее выраженной форме, у многих условно здоровых жителей крупных промышленных городов (нарушения проводимости и чувствительности конечностей, частые головные боли и хроническая слабость, повышение количества граждан с когнитивными расстройствами и признаками ранней деменции, расстройства функции печени и др.). Полученные результаты указывают на возможность влияния выявленных взаимодействий токсичных и эссенциальных металлов с регуляторными и транспортными белками в развитии функциональных расстройств и патологических процессов.

ВЫВОДЫ

Значительная часть белков сыворотки крови человека, в том числе не являющихся металлопротеинами, взаимодействует с ионами металлов в эксперименте *in vitro*. Высокая активность взаимодействия белков с условно-эссенциальным кадмием и токсичной ртутью свидетельствует о возможности реализации патогенетических механизмов интоксикации данными металлами через нарушение структуры и функции белков крови. Взаимодействие металлопротеина а2-МГ с условно-эссенциальными и токсичными металлами, выявленное *in vitro*, в условиях *in vivo* может проходить по типу конкурентного взаимодействия металл–металл и оказывать негативное влияние на структуру и функции данного регуляторно-транспортного белка. Механизмы взаимодействия и обратимость связывания белков с металлами в условиях *in vivo* требуют дополнительного изучения.

Литература

1. Wang F, Chmil C, Pierce F, Ganapathy K, Gump B, MacKenzie J, Mechref Y, Bendinskas K. Immobilized metal affinity chromatography and human serum proteomics. Journal of Chromatography B. 2013; 934: 26–33.
2. Witkowska D, Rowińska-Żyrek M, Witkowska D, Rowińska-Żyrek M. Biophysical approaches for the study of metal-protein interactions. Journal of Inorganic Biochemistry. 2019; 199: 110783.
3. Ложкин А. П., Биктагиров Т. Б., Абдульянов В. А., Горшков О. В., Тимонина Е. В., Мамин Г. В., и др. Марганец в атерогенезе:

обнаружение, происхождение и роль. Биомедицинская химия. 2012; 58 (3): 291–99.
4. Aschner M, Costa LG. Neurotoxicity of Metals. Springer International Publishing AG, 2017; 383 p.
5. Русецкая Н. Ю., Бородулин В. Б. Биологическая активность селенорганических соединений при интоксикации солями тяжелых металлов. Биомедицинская химия. 2015; 61 (4): 449–61.
6. Зорина В. Н., Зорина Р. М., Зорин Н. А. Особенности взаимодействия белков семейства макроглобулинов между собой и с рецепторами эндоцитоза (возможный механизм трансмембранного переноса). Биомедицинская химия. 2011; 57 (1): 106–13.
7. Барашков Г. К., Зайцева Л. И., Кондахчан М. А., Константинова Е. А., Распределение химических элементов в цельной крови и плазме. Биомедицинская химия. 2003; 49 (3): 297–302.
8. Зорин Н. А., Зорина Р. М., Зорина В. Н. Получение препаратов α-макроглобулина с заданными свойствами. Гематология и трансфузиология. 2000; 45 (5): 20–21.
9. Emmet M, Crowle AJ. Crossed immunoelectrophoresis: qualitative and quantitative considerations. J Immunol Meth. 1982; 50: R65–R83.
10. Manley SA, Byrns S, Lyon AW, Brown P, Gailer J. Simultaneous Cu-, Fe-, and Zn- specific detection of metalloproteins contained in rabbit plasma by size-exclusion chromatography–inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. Biol Inorg Chem. 2009; 14: 61–74.
11. Чекнёв С. Б. Белки γ-глобулиновой фракции, хелатирующие катионы металлов, в физиологической иммунорегуляции. Оппозитные эффекты меди и цинка. Иммунология. 2021; 42 (3): 293–300.
12. Genchi G, Sinicropi M, Lauria G, Carocci A, Catalano A. The Effects of Cadmium Toxicity. Int J Environ Res Public Health. 2020; 17 (11): 3782.
13. Ynalvez R, Gutierrez J, Gonzalez-Cantu H. Mini-review: toxicity of mercury as a consequence of enzyme alteration. Biometals. 2016; 29 (5): 781–8.
14. Кошкина В. С., Котляр Н. Н., Котельникова Л. В., Долгушина Н. А. Клинико-токсикологическая характеристика свинца и его соединений. Медицинские новости. 2013; 1: 20–25.
15. Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Malavolta M. Zinc-binding proteins (metallothionein and a-2 macroglobulin) and immunosenescence. Experimental Gerontology. 2006; 41: 1094–7.
16. Assi MA, Hezmee MN, Haron AW, Sabri MY, Rajion MA. The detrimental effects of lead on human and animal health. Vet World. 2016; 9 (6): 660–71.
17. Мазунина Д. Л. Негативные эффекты марганца при хроническом поступлении в организм с питьевой водой. Экология человека. 2015; 3: 25–31.
18. Heeb MJ, Gruber A, Griffin JH. Identification of Divalent Metal Ion-dependent Inhibition of Activated Protein Cbycr2-Macroglobulin and cr2-Antiplasminin Blood and Comparisons to Inhibition of Factor Xa, Thrombin, and Plasmin. The Jounal of Biological chemistry. 1991; 266 (26): 17606–12.

References

1. Wang F, Chmil C, Pierce F, Ganapathy K, Gump B, MacKenzie J, Mechref Y, Bendinskas K. Immobilized metal affinity chromatography and human serum proteomics. Journal of Chromatography B. 2013; 934: 26–33.
2. Witkowska D, Rowińska-Żyrek M, Witkowska D, Rowińska-Żyrek M. Biophysical approaches for the study of metal-protein interactions. Journal of Inorganic Biochemistry. 2019; 199: 110783.
3. Lozhkin AP, Biktagirov TB, Abdulyanov VA, Gorshkov OV, Timonina EV, Mamin GV, i dr. Marganec v aterogeneze: obnaruzhenie, proisxozhdenie i rol'. Biomedicinskaya ximiya. 2012; 58 (3): 291–99. Russian.
4. Aschner M, Costa LG. Neurotoxicity of Metals. Springer International Publishing AG, 2017; 383 p.
5. Ruseckaya NYu, Borodulin VB. Biologicheskaya aktivnost' selenorganicheskix soedinenij pri intoksikacii solyami tyazhelyx metallov. Biomedicinskaya ximiya. 2015; 61 (4): 449–61. Russian.
6. Zorina VN, Zorina RM, Zorin NA. Osobennosti vzaimodejstviya belkov semejstva makroglobulinov mezhdu soboj i s receptorami ehndocitoza (vozmozhnyj mexanizm transmembrannogo perenosa). Biomedicinskaya ximiya. 2011; 57 (1): 106–13. Russian.
7. Barashkov GK, Zajceva LI, Kondaxchan MA, Konstantinova EA, Raspredelenie ximicheskix ehlementov v cel'noj krovi i plazme. Biomedicinskaya ximiya. 2003; 49 (3): 297–302. Russian.
8. Zorin NA, Zorina RM, Zorina VN. Poluchenie preparatov α-makroglobulina s zadannymi svojstvami. Gematologiya i transfuziologiya. 2000; 45 (5): 20–21. Russian.
9. Emmet M, Crowle AJ. Crossed immunoelectrophoresis: qualitative and quantitative considerations. J Immunol Meth. 1982; 50: R65–R83.
10. Manley SA, Byrns S, Lyon AW, Brown P, Gailer J. Simultaneous Cu-, Fe-, and Zn- specific detection of metalloproteins contained in rabbit plasma by size-exclusion chromatography–inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. Biol Inorg Chem. 2009; 14: 61–74.
11. Cheknyov SB. Belki γ-globulinovoj frakcii, xelatiruyushhie kationy metallov, v fiziologicheskoj immunoregulyacii. Oppozitnye ehffekty medi i cinka. Immunologiya. 2021; 42 (3): 293–300. Russian.
12. Genchi G, Sinicropi M, Lauria G, Carocci A, Catalano A. The Effects of Cadmium Toxicity. Int J Environ Res Public Health. 2020; 17 (11): 3782.
13. Ynalvez R, Gutierrez J, Gonzalez-Cantu H. Mini-review: toxicity of mercury as a consequence of enzyme alteration. Biometals. 2016; 29 (5): 781–8.
14. Koshkina VS. Kotlyar NN, Kotelnikova LV, Dolgushina NA. Kliniko-toksikologicheskaya xarakteristika svinca i ego soedinenij. Medicinskie novosti. 2013; 1: 20–25. Russian.
15. Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Malavolta M. Zinc-binding proteins (metallothionein and a-2 macroglobulin) and immunosenescence. Experimental Gerontology. 2006; 41: 1094–7.
16. Assi MA, Hezmee MN, Haron AW, Sabri MY, Rajion MA. The detrimental effects of lead on human and animal health. Vet World. 2016; 9 (6): 660–71.
17. Mazunina DL. Negativnye ehffekty marganca pri xronicheskom postuplenii v organizm s pit'evoj vodoj. Ehkologiya cheloveka. 2015; 3: 25–31. Russian.
18. Heeb MJ, Gruber A, Griffin JH. Identification of Divalent Metal Ion-dependent Inhibition of Activated Protein Cbycr2-Macroglobulin and cr2-Antiplasminin Blood and Comparisons to Inhibition of Factor Xa, Thrombin, and Plasmin. The Jounal of Biological chemistry. 1991; 266 (26): 17606–12.