

РОЛЬ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ROLE OF METALLOTHIONEIN IN THE NERVOUS SYSTEM

*Л.М. Шафран, Е.Г. Пыхтеева**

*L.M. Shafran, E.G. Pykhtieieva**

Украинский НИИ медицины транспорта, Одесса, Украина

Ukrainian Research Institute of Medicine on Transport, Odessa, Ukraine

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: металлотионеины, центральная нервная система, нейродегенеративные заболевания

KEY WORDS: metallothioneins, central nervous system, neurodegenerative diseases

РЕЗЮМЕ: В мозге кроме изоформ металлотионенина МТН-1 и МТН-2 происходит синтез специализированной изоформы (МТН-3), которая обеспечивает анализаторные, нейрофизиологические и нейромодуляторные функции, синаптическую передачу и работу транзиттеров, а также защиту от формирования агрегированных амилоидных образований. МТН участвует в процессах развития, роста и дифференциации клеток головного мозга, регулируя процессы жизнедеятельности и клеточной смерти как важных защитных механизмов ЦНС. Перспективным направлением является изучение возможностей использования экзогенного белка в терапевтических целях при лечении заболеваний ЦНС.

ABSTRACT: Metallothionein (MTN) does many different physiological functions in the CNS. An additional specialized isoform MTN-3 is synthesized in the brain. It provides protection from aggregated amyloid particles which play a major role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. MTN is involved in the processes of development, growth and differentiation of brain cells and performs specific functions in neurons, astrocytes and neuroglia. MTN-3 regulates the processes of cell life and death in the CNS. One promising direction is exploring the use of exogenous MTN in the treatment of CNS diseases.

Одним из наиболее сложных и недостаточно изученных видов специфического действия химических веществ на организм человека и животных является нейротоксичность. Это обусловлено биоинформационной, коммуникативной, интегративной, регуляторной и защитной функциями нервной системы, многоуровневым иерархическим характером строения с высокой гетерогенностью и специфичностью многочисленных элементов, взаимодействующих в ходе генерирования и передачи нервных сигналов, а также преимущественно эндогенными механизмами, лежащими в основе повреждения нервной системы (эндогенизация патологических процессов) (Крыжановский, 1997).

Важная роль в этих процессах принадлежит низкомолекулярным белкам, которые обнаружены и обладают избирательным местоположением в различных областях, структурах и клетках головного мозга, где выполняют разнообразные сигнальные, регуляторные, транспортные и другие функции самостоятельно или во взаимодействии друг с другом, высокомолекулярными рецепторами, мембранными элементами клеток, а также образуют цепи и каскады из большого числа взаимодействующих элементов, позволяющих осуществлять поэтапное управление сложными процессами передачи сигналов от сенсорных образований к соответствующим эффекторам, реализующим ответные реакции на разнообразные внешние и эндогенные стимулы.

Среди этих белков особое место занимает металлотионеин (МТН). Он представляет собой низкомолекулярный белок с молекулярной массой

*Адрес для переписки: Пыхтеева Елена Геракли-товна, к.х.н., зав. лабораторией промышленной и экологической токсикологии; Украина, 65039, Одесса, ул. Канатная, 92, Украинский НИИ медицины транспорта; E-mail: pykhteeva@rambler.ru

около 6500 кДа, содержит 60–62 остатка аминокислот, среди которых отсутствуют ароматические аминокислоты, а около 30% по массе составляют остатки цистеина (Cys), которые находятся в восстановленной форме и скоординированы с ионами металлов через SH-группы (Narula et al., 1995).

Открытый более 50 лет тому назад В.Л. Vallee с сотрудниками как транспортер Cd и Zn, МТН оказался представителем уникального семейства многофункциональных белков, которые выполняют важные физиологические функции в гомеостазе эссенциальных металлов, регуляции клеточного метаболизма, купировании оксидативного стресса, детоксикации ряда ксенобиотиков (Jacob et al., 1998; Thirumoorthy et al., 2007). Апопротеин МТН (тионин) является не только мощным акцептором Zn, но и образует со своим металлизированным комплексом динамичную систему, которая благодаря наличию двух кластеров (α и β), активных тиолатных комплексов и биодоступных ионов двух эссенциальных металлов (Zn и Cu), позволяет данному металлопротеину участвовать в широком круге биохимических процессов в различных клетках, органах и тканях.

Однако, если для гепаторенальной и кишечниальной систем индукция биосинтеза и участие МТН в метаболизме клеток определяется прежде всего его защитными свойствами, то применительно к ЦНС такое объяснение не является очевидным, учитывая наличие гематоэнцефалического барьера, относительной автономности питания, оксигенации и энергопотребления. Поэтому важная роль МТН в функционировании ЦНС вероятно определяется прежде всего его участием в эндогенных метаболических путях и механизмах.

Поскольку эти взаимосвязи остаются недостаточно изученными, целью настоящего обзора явился анализ литературы и собственных данных для систематизации накопленной разрозненной информации, уточнения ряда позиций и обоснования возможности использования уникальных свойств этого белка в профилактике и лечении нейроинтоксикаций, нейродегенеративных и других заболеваний нервной системы.

Нейроспецифические эффекты МТН привлекли к себе особое внимание после открытия в 1990 г. его специализированной изоформы МТН-3, синтезируемой в клетках головного мозга. Поскольку, в отличие от экспрессируемых практически во всех органах и тканях изоформ МТН-1 и МТН-2, изоформа МТН-3 специфична исключительно для ЦНС, предполагают выполнение ею важных нейрофизиологических и нейромодулирующих функций именно в нервных клетках (Kameo et al., 2005). Для понимания функций этих белков в мозге большую помощь оказывают опыты на трансгенных мышах (Hidalgo, 2004). Комплексные исследования на нокаутных по МТН-1 и МТН-2 мышах и животных с гиперэкспрессией МТН-1 показали, что МТН-1 и МТН-2 выполняют

преимущественно антиоксидантную, противовоспалительную и антиапоптозную роль в мозге. Установлено также, что МТН-3 выполняет в нервной системе иные, прежде всего регуляторные, функции. Он обеспечивает в основном процессы выживания и развития организма, роста нервов и нервных волокон, играет роль модулятора, выполняет и участвует в осуществлении нейротрансмиссивных функций в головном мозге (Hidalgo et al., 2001).

Среди патологических процессов, связанных с нарушением функций МТН в ЦНС, пожалуй, наиболее типичными являются поражения структур головного мозга кадмием и ртутью, приводящие к металлонеуротоксикозам. Это особенно актуально для всестороннего изучения в связи с возрастающими уровнями антропогенного загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами, увеличением вклада электронных и электротехнических изделий в этот процесс, который коррелирует с ростом числа нарушений высших психических функций, поведенческих и нервно-психических расстройств и заболеваний среди различных континентов людей детского, трудоспособного и пенсионного возраста (Dorea, 2010).

Для детального изучения функциональной активности МТН-3 в качестве экспериментальной модели использовали нокаутных по МТН-1 и МТН-2 мышей, подвергнутых ингаляционному воздействию парами ртути в течение 2 ч. и исследованных через 24 ч. Концентрации ртути в тканях мозга (церебральная кора, мозжечок и гиппокамп) определяли методом холодного пара. Кроме того, ртуть, медь, цинк определяли методом ICP-MS. Пары ртути адсорбируются при ингаляции в легких и легко проникают через гематоэнцефалический барьер. Поэтому симптомы поражения ЦНС возникают уже на первых этапах отравления (Dorea, 2010).

Yoshida M. с соавт. (2008) изучали нейроповеденческие эффекты у экспонированных парами ртути МТН-0 и мышей дикого типа. Беременных мышей обеих линий с первого по 18-й день гестации экспонировали парами ртути в концентрации 0,5–0,56 мг/м³ по 6 ч. в день. Указанное воздействие вызывало изменение у потомства локомоторной активности в открытом поле и способности к обучению на 12-й неделе после рождения. У МТН-0 мышей отмечено существенное снижение общей локомоторной активности у самцов и нарушение обучаемости (пассивного избегания) у самок по сравнению с контролем (мышами дикого типа). Концентрация ртути в мозге новорожденных мышей и в возрасте 12 недель оставалась повышенной в обеих группах по сравнению с интактными животными, причем у самок концентрации ртути были выше, чем у самцов. У МТН-0 мышей обнаруженные эффекты зависели от недостатка МТН-1 и МТН-2 в мозге, которые выполняют универсальную защитную роль в ЦНС (Stankovic et al., 2007).

В ряде работ проведен анализ влияния Cd на нервную систему. Клинические проявления воздействия характеризуются увеличением частоты головных болей, головокружением, усилением коленного рефлекса, тремора, дермографизма, нарушением сенсорной и моторной хронаксии. Новорожденные более чувствительны к нейротоксическому действию кадмия. Это, по-видимому, связано с повышенной проницаемостью гематоэнцефалического барьера для кадмия у новорожденных. Кроме того, обнаружено блокирующее действие этого металла на адренергические и холинергические синапсы. Кадмий оказывает выраженное влияние на обмен ряда микроэлементов, в первую очередь алюминия, меди, железа и олова. Это взаимодействие проявляется на уровне ферментативных процессов, всасывания, накопления и выведения из организма (Berlet et al., 1994; Lockman et al., 2001). Холиновый транспорт через гематоэнцефалический барьер и поглощение холина клетками головного мозга ингибировались ионами металлов (Cd на 73 ± 2 , Mn на 44 ± 6), тогда как Cu и Al на этот процесс не влияли. Связывание ионов металлов с основным белком миелина (МВР) происходило в порядке: $Hg > Cu > Zn > Mg > Cd > Co$, и не включало Mn, Pb и Ca. Последнее в известной мере согласуется с включением

МТН в процессы связывания и транспорта металлов в ряде отделов ЦНС.

Как и в других тканях, МТН в мозге в физиологических условиях характеризуется полифункциональностью: он связан с метаболизмом и гомеостазом эссенциальных металлов, восстановительными процессами в генетическом аппарате, в частности, ДНК, ростом и дифференцировкой клеток, в которых МТН служит источником цинка для вновь синтезируемых апоэнзимов либо выступает как регуляторная молекула, участвующая в экспрессии определенных генов. Его дополнительными функциями являются контроль клеточного восстановительного потенциала и гашение свободных радикалов. Такая полимодальность МТН четко прослеживается и при патологии ЦНС (табл. 1).

Влияние кадмия на анализаторные функции подтверждается результатами экспериментальных исследований на препаратах оптического нерва (Fern et al., 1996). Стоминутная экспозиция Cd^{2+} в концентрации 200 мкМ снижала электрорхимический потенциал оптического нерва в 2,3 раза по отношению к контролю. Это угнетение не снималось 120-минутной реперфузией раствором, содержащим хелаторы кадмия. Рост экстрацеллюлярного Ca^{2+} до 16 мМ предотвращал ингиби-

Таблица 1. *Функции металлотионеинов в ЦНС в норме и патологии (адаптировано из Aschner, 1996)*

Физиология		Патология	
1	Поступление и распределение ионов меди и цинка	1	Усиление свободнорадикального окисления
2	Регуляция биосинтеза и активности комплекса Zn-МТН	2	Образование амилоидных агрегатов и неродегенерация
3	Защита клеток от повреждающего действия свободных радикалов	3	Нарушение укладки нейрофибрилл
4	Регуляция экспрессии генов	4	Усиление апоптоза
5	Защита клеток от повреждений тяжелыми металлами	5	Нарушение синаптической передачи нервных импульсов
6	Компартментализация цинка, поставка Zn-зависимым ферментам и транскрипционным факторам в астроцитах и нейронах	6	Развитие воспалительных процессов
7	Удаление ионов тяжелых металлов из клеток, цереброспинальной жидкости, экстрацеллюлярного пространства	7	Металлнейротоксикозы
8	Нейромодуляция глутамат- и ГАМК-эргических рецепторов и передачи сигналов, в первую очередь, в Zn-эргических и МТН-3 экспрессирующих нейронах	8	Онкогенез в нервной системе

рующее действие кадмия. При комбинации Cd^{2+} в концентрации 60 мкМ с экстрацеллюлярным K^+ (30 мМ) наблюдалось угнетение потенциала действия. Полученные данные показывают, что Cd^{2+} ингибирует потенциал- и лигандуправляемые кальциевые каналы, в том числе активируемые Ca^{2+} калиевые каналы и обменники $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Кроме того, кадмий оказывает ингибирующее влияние на Ca^{2+} -АТФазу.

Приведенные в качестве иллюстрации опубликованные в последние годы экспериментальные данные о нейротоксичности Hg и Cd являются примером успешного использования современных токсикогеномных и протеомных технологий в междисциплинарной проблеме металлотииониев. Новые методические подходы, постановка опыта на трансгенных организмах и линиях клеток *in vitro* позволили также получить принципиально новую информацию о нейротоксичности Hg не только в ее органических, но и неорганических соединениях. Кадмий, который в течение длительного времени рассматривался исключительно как нефротоксикант, оказался общетоксическим ядом с более широким спектром повреждающего биологического действия. Причем, он прочно вошел в число не только нейротоксикантов (Horvath et al., 2011), но и облигатных разрушителей системы оплодотворения, роста и развития (Apostoli, Catalani, 2011). Он также нарушает работу биологических часов в организме (Caride et al., 2010).

Приведенные данные представляют интерес также в плане подтверждения позитивной роли синтезируемого в астроцитах МТН в защите ЦНС от токсичных металлов, а также его участия в предотвращении и восстановлении целостности миелиновой оболочки нервов после патологической демиелинизации (Fernandez-Perez et al., 2010). Если защита нейронов осуществляется с участием МТН-3, то нейропротекторные и репаративные свойства присущи только МТН-1 и МТН-2, которые синтезируются в ответ на действие ТМ и стрессоров другой природы в клетках ЦНС точно так же, как и во многих других органах. Именно эти изоформы МТН, регулирующие гомеостаз цинка, контролируют металлсодержащие транскрипционные факторы, участвующие в биосинтезе данного белка, включая цинк-содержащие пальцевидные белки и р53. Следовательно, индуктивные свойства кадмия и ртути по отношению к МТН реализуются в ЦНС с участием генома астроцитов и глиальных клеток по универсальному механизму.

Позиции МТН-3 существенно отличны от других изоформ данного белка и в генетическом плане. В частности, показано, что специфичные для головного мозга гены МТН-3 экспрессируются в цинк-содержащих нейронах гиппокампа, но полностью отсутствуют в глиальных элементах (Penkowa, Hidalgo, 2003). Металлотииониевы вовлечены как регуляторные молекулы в процесс экспрессии соответствующих генов, гомеостати-

ческий контроль клеточного метаболизма металлов, а также процесс адаптации клеток к стрессу. Подчеркивается, что МТН выполняет прежде всего регуляторную роль и влияет на процессы транскрипции, репликации, синтеза белка, метаболизма в клетках, а также широкий круг зависящих от цинка биологических процессов. Поскольку наличие МТН-3 является обязательным атрибутом для цинксодержащих нейронов гиппокампа, можно предположить его важную нейромодуляторную роль в этих клетках, где он является своеобразной ловушкой и депо для свободного обменяемого цинка. Он может играть определенную патогенетическую роль в условиях повышенного содержания экстрацеллюлярного цинка. При этом он также предотвращает неконтролируемый рост нейронов *in vitro*, а нарушение его регуляторной функции играет важную роль в развитии болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний. Нокаутные по МТН-3 мыши становятся высокочувствительными к обусловленным каиновой кислотой (нейроцитотоксикант, агонист инотропных глутаматзависимых каиновых рецепторов) поражениям нервной системы (Aschner, 1996). Это позволяет предположить важную роль дизрегуляторных сдвигов в функционировании МТН-3 в процессах нейродегенерации.

При острых экспериментальных поражениях головного мозга резко возрастает уровень как мРНК МТН, так и самого белка. Последний нарастает медленнее и остается повышенным в течение более длительного времени, чем фибриллярный кислый белок GFAP, ответственный за структурообразование, межклеточную сигнализацию и митоз астроцитов и глиальных клеток. Это различие в активности и распределении МТН-3 и GFAP является важным элементом механизма восстановления нарушенных заболеваний тканей мозга (Sonn et al., 2010). Оно определяется не столько их уровнем экспрессии в мозге, как активностью в реактогенных астроцитах, окружающих очаги сенильных агрегатов β -амилоида в нервной ткани, поврежденной болезнью Альцгеймера, первого по частоте нейродегенеративного заболевания у людей старше 60 лет.

И хотя в профилактике поражений головного мозга экзогенными стрессорами принимают участие многие внутриклеточные белки, металлотииониевы, благодаря своим антирадикальным свойствам и металлорегуляторной функции в клетках ЦНС, в первую очередь, астроцитах, по праву занимают в системе нейропротекции ведущую роль. Это определяется также участием МТН в репаративных процессах на уровне нейронов, астроцитов и регенерации аксонов нервных клеток. Во-первых, экстрацеллюлярный МТН обязательно присутствует в жидких средах пораженного заболевания головного мозга; во-вторых, был идентифицирован рецептор мегалин, который взаимосвязан с транспортом МТН в нейронах; в-третьих,

было непосредственно показано, что в опытах *in vitro* имеет место переход МТН из астроцитов в нейроны; и в-четвертых, продемонстрирована быстрая интернизация МТН клетками ретиноидных ганглиев *in vivo*, где МТН выступает мощным промотором аксональной регенерации оптического нерва. Именно таким образом была доказана возможность и целесообразность применения МТН при заболеваниях и токсических поражениях ЦНС как мощного терапевтического средства (Sonn et al., 2010).

Полученные данные открывают потенциальную возможность управления патогенезом нейродегенеративных повреждений ЦНС путем введения экзогенного МТН-3. Они также подтверждают важную роль МТН в активации глиальных клеток (в частности, астроцитов), как одного из ведущих механизмов осуществляемой этим белком нейропротекции.

ВЫВОДЫ

1. МТН выполняет в ЦНС широкий круг разнообразных физиологических функций, гетерогенный характер которых и взаимосвязь с различными типами клеток и мозговыми структурами потребовали появления, наряду с общими (МТН-1 и МТН-2), синтеза специализированной изоформы (МТН-3), которая обеспечивает аналитические, нейрофизиологические и нейромодуляторные функции, синаптическую передачу и работу трансмиттеров, а также защиту от формирования агрегированных амилоидных образований, играющих ведущую роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний.

2. МТН участвует в процессах развития, роста и дифференциации клеток головного мозга, выполняет специфические функции в нейронах, астроцитах и нейроглии, регулируя процессы жизнедеятельности и клеточной смерти как важных защитных механизмов ЦНС.

3. Перспективным направлением исследований нейротропных эффектов МТН является использование экзогенного белка в терапевтических целях, что является одним из приоритетных и перспективных направлений новых исследований по проблеме МТН.

ЛИТЕРАТУРА

- Крыжановский Г.Н.* Общая патофизиология нервной системы. Руководство. М.: Медицина, 1997. 352 с.
- Apostoli P., Catalani S.* Metal ions affecting reproduction and development // *Met Ions Life Sci.* 2011, 8:263–303.
- Aschner M.* The functional significance of brain metallothioneins // *FASEB J.* 1996, 10(10):1129–1136.
- Berlet H.H., Bischoff H., Weinhardt F.* Divalent metals of myelin and their differential binding by myelin basic protein of bovine central nervous system // *Neurosci Lett.* 1994, 179(1–2):75–78.
- Caride A., Fernandez-Perez B., Cabaleiro T. et al.* Cadmium chronotoxicity at pituitary level: effects on plasma ACTH, GH, and TSH daily pattern // *J Physiol Biochem.* 2010, 66(3):213–220.
- Dorea J.G.* Research into mercury exposure and health education in subsistence fish-eating communities of the Amazon basin: potential effects on public health policy // *Int J Environ Res Public Health.* 2010, 9:3467–3477.
- Fern R., Black J.A., Ransom B.R. et al.* Cd(2+)-induced injury in CNS white matter // *J Neurophysiol.* 1996, 76(5):3264–3273.
- Fernandez-Perez B., Caride A., Cabaleiro T. et al.* Cadmium effects on 24h changes in glutamate, aspartate, glutamine, GABA and taurine content of rat striatum // *J Trace Elem Med Biol.* 2010, 24(3):212–218.
- Hidalgo J.* Metallothioneins and brain injury: What transgenic mice tell us // *Environ Health Prev Med.* 2004, 9(3):87–94.
- Hidalgo J., Aschner M., Zatta P., Vasak M.* Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system // *Brain Res Bull.* 2001, 55(2):133–145.
- Horvath E., Oszlanczi G., Mate Z. et al.* Nervous system effects of dissolved and nanoparticulate cadmium in rats in subacute exposure // *J Appl Toxicol.* 2011, 31:471–476.
- Jacob C., Maret W., Vallee B.L.* Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998, 31:95(7):3489–3494.
- Kameo S., Nakai K., Kurokawa N.* Metal components analysis of metallothionein-III in the brain sections of metallothionein-I and metallothionein-II null mice exposed to mercury vapor with HPLC/ICP-MS // *Anal Bioanal Chem.* 2005, 381(8):1514–1519.
- Lockman P.R., Roder K.E., Allen D.D.* Inhibition of the rat blood-brain barrier choline transporter by manganese chloride // *J Neurochem.* 2001, 79(3):588–594.
- Narula S.S., Brouwer M., Hua Y., Armitage I.M.* Three-dimensional solution structure of *Callinectes sapidus* metallothionein-I determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy // *Biochemistry.* 1995, 34(2):620–631.
- Penkowa M., Hidalgo J.* Treatment with metallothionein prevents demyelination and axonal damage and increases oligodendrocyte precursors and tissue repair during experimental autoimmune encephalomyelitis // *J Neurosci Res.* 2003, 72(5):574–586.
- Sonn K., Pankratova S., Korshunova I. et al.* A metallothionein mimetic peptide protects neurons against kainic acid-induced excitotoxicity // *J Neurosci Res.* 2010, 88(5):1074–1082.
- Stankovic R.K., Chung R.S., Penkowa M.* Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology // *Int J Biochem Cell Biol.* 2007, 39(3):484–489.
- Thirumoorthy N., Manisenthil Kumar K.T., Shyam Sundar A. et al.* Metallothionein: an overview // *World J Gastroenterol.* 2007, 13(7):993–996.
- Yoshida M., Shimizu N., Suzuki M. et al.* Emergence of delayed methylmercury toxicity after perinatal exposure in metallothionein-null and wild-type C57BL mice // *Environ Health Perspect.* 2008, 116(6):746–751.