

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

АКТИВАЦИЯ КАЛЬПАИНОВ В СТРИАТУМЕ ПОСЛЕ ИНТРАНАЗАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ХЛОРИДА МАРГАНЦА

И.С. Ивлева^{1*}, Н.С. Пестерева¹, З.М. Муружева¹,
М.А. Тихомирова², М.Н. Карпенко^{1,3}

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Физиологический отдел им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

² Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, Цюрих, Швейцария

³ СПбПУ им. Петра Великого, Кафедра биофизики, Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций, Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ. Повышение содержания эссенциального микроэлемента марганца в организме приводит к развитию тяжелых нарушений центральной нервной системы, напоминающих по симптоматике болезнь Паркинсона, – состоянию, называемому марганцевой энцефалопатией. Выбор лечения данной формы патологии в настоящее время ограничен препаратами леводопы и ЭДТА; в обоих случаях наблюдается неустойчивый терапевтический эффект. Поэтому необходим поиск новых мишеней для эффективного фармакологического воздействия с целью подавления развития или снижения выраженности марганцевой энцефалопатии. Неконтролируемая активация кальпаинов, кальций-зависимых протеаз, приводит к гибели нейронов, особенно дофаминергических. Проведено исследование, подтверждающее участие, кальпаинов в патогенезе марганцевой энцефалопатии на животной модели. Показано, что марганец индуцирует рост активности кальпаина-2 в стриатуме, где активность кальпаина-1 также увеличивается. Выявлено, что марганец непосредственно активирует кальпаин-1, подобно кальцию, однако не приводит к активации кальпаина-2 *in vitro*. Возможно, кальпаины могут быть потенциальными терапевтическими мишенями для лечения марганцевой энцефалопатии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: марганец, марганцевая энцефалопатия, нейродегенерация, кальпаины.

ВВЕДЕНИЕ

Марганец – эссенциальный микроэлемент, который необходим для функционирования многих ферментов, включая белки семейства оксидоредуктаз, трансфераз и др. Повышение содержания марганца в организме, вызванное преимущественно промышленными отравлениями, приводит к развитию тяжелых нарушений центральной нервной системы, напоминающих по симптоматике болезнь Паркинсона (БП). Особенностью БП является гиперактивация кальпаиновой системы (Samantaray et al., 2008). Кальпаины представляют собой внутриклеточные Ca²⁺-зависимые цистеиновые протеазы. Неконтролируемая активация кальпаинов вызывает преимущественно дегенерацию дофаминергических нейронов.

Цель исследования – изучить гипотезу о вовлечении кальпаиновой системы в

механизмы, реализующие эффект нейротоксичности соединений марганца, привести доказательства, подтверждающие увеличение активности кальпаина-1 (calp1) и кальпаина-2 (calp2) в стриатуме лабораторных крыс, и продемонстрировать, что марганец, подобно кальцию, непосредственно активирует calp1 *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на крысах линии Вистар, массой 220–250 г ($n = 20$). Экспериментальная группа крыс ($n = 10$) получала интраназально MnCl₂ (1 мг в день на одно животное) в течение 90 дней, контрольные животные ($n = 10$) – тот же объем физиологического раствора. Используя метод атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС), измеряли уровни марганца в стриатуме. Методом обратной транскрипции полимеразно-цепной реакции (ОТ-ПЦР) и полимеразно-

* Адрес для переписки:

Ивлева Ирина Сергеевна

E-mail: I.s.oblamskaya@mail.ru

цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) определяли уровни мРНК calp1/2. В качестве генов «домашнего хозяйства» были выбраны гены *GAPDH* и *Cycr*. Активность calp1/2 выявляли методом казеиновой зимографии. Для этого валовый белок, выделенный из мозга, разделяли на полиакриламидном геле, сополимеризованном с казеином. Затем гель был проинкубирован в активационном буфере с кальцием и окрашен Coomassie brilliant blue R-250.

Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 8.0 (StatSoft). Все данные выражали как среднее \pm ошибка среднего. Распределение данных проверяли на нормальность с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Статистические различия были проверены *t*-тестом. Результаты считались статистически значимым при $p < 0,05$.

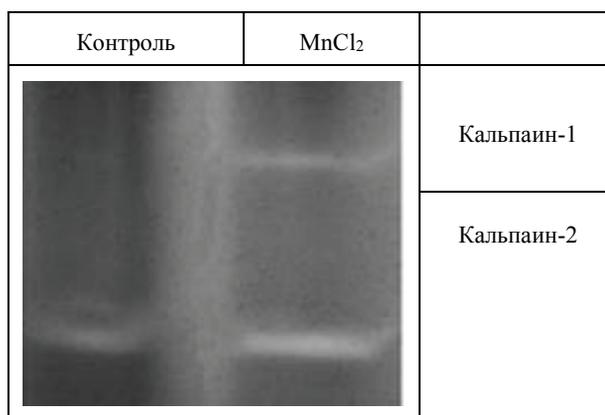
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения концентрации марганца в стриатуме контрольных и эксперимен-

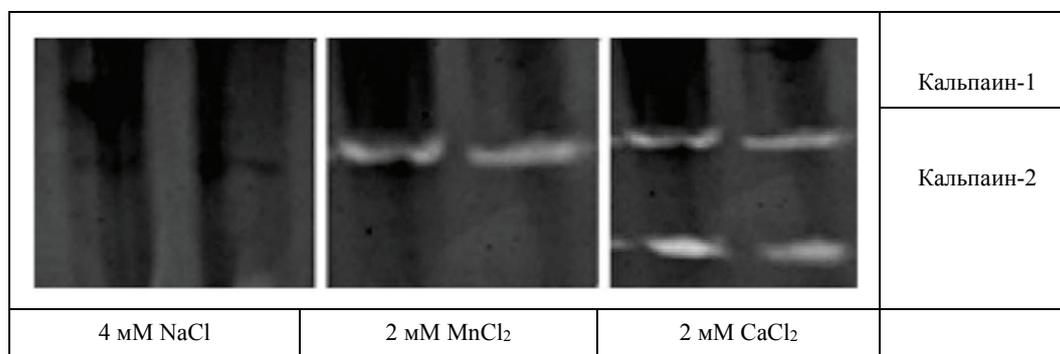
тальных крыс показали, что концентрация этого элемента у экспериментальных крыс увеличилась на 320% – с $0,77 \pm 0,22$ (контрольные значения) до $3,22 \pm 0,26$ нг/г ткани ($p = 0,006$). Установлено, что введение марганца, приводит к увеличению экспрессии мРНК calp2 в 2 раза – от $1,00 \pm 0,18$ (контрольные значения) до $2,11 \pm 0,08$ относительных единиц ($p = 0,000$) в стриатуме экспериментальных животных, при этом экспрессия мРНК calp1 не изменилась.

Дифференциальные изменения активности кальпаина в стриатуме животных, получавших интраназальные инъекции $MnCl_2$, измеряли с помощью казеиновой зимографии (рисунок, а). Обнаружено, что активность двух изоформ кальпаина увеличивается.

Чтобы дополнительно проанализировать способность марганца непосредственно активировать кальпаины, гомогенаты стриатума, полученные из интактных крыс, разделили на полиакриламидном геле, сополимеризованном с казеином.



а)



б)

Активация кальпаина-1 и кальпаина-2 в стриатуме животных:

а – при введении $MnCl_2$; б – при инкубации в буферах с различными добавками, указанными на рисунке. Яркие области соответствуют областям активного протеолиза кальпаина-1 или -2

Далее гель был разделен на три части, каждую из которых инкубировали в активационном буфере с различными добавками: 2 мМ CaCl₂, или 2 мМ MnCl₂, или 4 мМ NaCl в 20 мМ Трис-HCl, 10 мМ дитиотреитола, pH 7,4 соответственно. Как можно видеть (рисунок, б), марганец активирует calp1 подобно кальцию, но инкубация с MnCl₂ не приводила к активации calp2. Инкубация геля с NaCl не индуцировала активацию кальпаинов.

Ключевой характеристикой нейродегенеративных процессов, включая марганцевую энцефалопатию, является наличие внутриклеточной перегрузки кальцием. Среди нескольких событий, которые происходят между увеличением уровня кальция и гибелью нейронов, активация кальпаинов играет ключевую роль в некоторых патологических состояниях. Чтобы оценить гипотезу о вовлечении кальпаиновой системы в механизмы, реализующие эффект нейротоксичности соединений марганца, использовали модель хронической интоксикации этого элемента на лабораторных крысах.

В исследовании (Quintanar et al., 2012) показано, что интратриальное введение MnCl₂ крысам в концентрации 50–250 нмоль сопровождается активированием кальпаина. Тем не менее авторы изучали общую активность кальпаинов, но не по отдельности для введения calp1 и calp2. Использование ингибитора кальпаинов MDL-28170 позволило снизить степень повреждения. Это доказывает вовлеченность кальпаиновой системы в интенсификацию нейродегенеративных процессов в данной модели. Однако внутритриальное введение соединений может вызвать индукцию самого нейровоспаления, что, в свою очередь, может активировать кальпаины. Эту сторону вопроса авторы не обсуждают. Проведенные ими эксперименты на гомогенатах мозга не исключают эффект опосредованной активации. Наши исследования позво-

ляют однозначно заключить, что calp1 активируется в присутствии ионов марганца, но такой вывод не может быть сделан для calp2.

Показано, что экспрессия мРНК calp2 увеличена в стриатуме экспериментальных животных. Интересно, что повышение протеолитической активности характерно для обоих членов кальпаиновой семьи. Вероятно, произошла следующая последовательность событий. Марганец, накопленный клетками, непосредственно активировал calp1. Поэтому повышение активности кальпаина не связано с увеличением его производства (см. рисунок). Быстрая активация calp1 запускает ряд различных сигнальных путей, в том числе реорганизацию цитоскелета и внеклеточный сигнально-регулируемый киназный путь.

ВЫВОДЫ

1. В результате интраназального введения MnCl₂ происходит накопление марганца в стриатуме лабораторных животных, что приводит к повышению активности calp1 за счет его прямой активации ионами Mn²⁺ но не за счет повышения уровня транскрипции гена calp1.
2. Повышение активности calp2 может объясняться активацией транскрипции гена calp2, в то время как сам синтезируемый фермент является Mn-независимым и активируется с участием традиционного Ca²⁺-зависимого механизма.

ЛИТЕРАТУРА

Chiu K., Lau W. M., Lau H. T., So K. F., & Chang R. C. Micro-dissection of rat brain for RNA or protein extraction from specific brain region. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2007; 7.

Quintanar L. et al. Calpain activation is involved in acute manganese neurotoxicity in the rat striatum in vivo. *Experimental neurology*. 2012; 233: 182–192.

Samantaray S., Ray S.K., Banik N.L. Calpain as a potential therapeutic target in Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 2008; 7: 305–312.

INTRANASAL EXPOSURE TO MANGANESE INDUCES ACTIVATION OF CALPAINS IN RAT STRIATUM

I. Ivleva¹, N. Pestereva¹, Z. Muruzheva¹, M. Tikhomirova², M. Karpenko^{1,3}

¹ Department of Physiology (Pavlov's), Institute of Experimental Medicine, Akademika Pavlova Street, 12, St. Petersburg, Russia

² Institute of Molecular Life Sciences, University of Zurich, Winterthurer strasse 190CH-8057, Zurich, Switzerland

³ Department of Biophysics, PHNT, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 29 Polytechnicheskaya St., St. Petersburg, Russia

ABSTRACT. Manganese (Mn) is an essential trace element. However, at abnormally high intake levels, Mn starts to predominantly accumulate in the brain and cause neurotoxicity. Chronic exposure to excessive Mn levels can lead to a variety of Parkinson-like psychiatric and motor disturbances, termed manganism.

Brain regions primarily affected by Mn are the basal ganglia, which is again similar to Parkinson disease. Treatment of manganism with levodopa and EDTA did not lead to a significant beneficial effect. For this reason, a search for new targets and pharmacological agents for treatment of Mn intoxication has become necessary.

Another well described feature of Parkinson disease is a hyperactivation of a calpain system. Calpains are intracellular Ca²⁺-dependent cysteine proteases. Uncontrolled activation of calpains leads to neuronal death especially in dopaminergic neurons. Here, we provide an evidence to support the involvement of the calcium-dependent proteases, calpains, in the pathogenesis of manganism in a rat model.

The participation of calpain-1 and calpain-2 was monitored in the striatum. Mn induced an increase of the activity of calpain-2 in the striatum, where the activity of calpain-1 was also increased but not its mRNA. We have also shown that Mn directly activates calpain-1 like calcium but not calpain-2 *in vitro*.

We propose that calpains can be potential therapeutic targets for manganism.

KEYWORDS: manganese, manganism, neurodegeneration, calpains.

REFERENCES

Chiu K., Lau W. M., Lau H. T., So K. F., & Chang R. C. Micro-dissection of rat brain for RNA or protein extraction from specific brain region. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2007; 7.

Quintanar L. et al. Calpain activation is involved in acute manganese neurotoxicity in the rat striatum *in vivo*. *Experimental neurology*. 2012; 233: 182–192.

Samantaray S., Ray S.K., Banik N.L. Calpain as a potential therapeutic target in Parkinson's disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 2008; 7: 305–312.