

**Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
“Санкт-Петербургский государственный политехнический университет”**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
“Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины”
Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук**

На правах рукописи

Затуловская Юлия Александровна

**РОЛЬ НАДПОЧЕЧНИКОВ В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА
МЕДИ В ПЕЧЕНИ**

03.01.04 – биохимия

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор
Л.В. Пучкова**

Санкт-Петербург

2014

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Биологическая роль меди.....	12
1.1.1. Купроэнзимы	12
1.1.2. Транспортная система меди	20
1.1.3. Гомеодинамика меди и медь-зависимый сигналинг	27
1.2. Эмбриональный и взрослый типы метаболизма меди	32
1.3. Надпочечники.....	35
1.6.1. Строение надпочечников.....	35
1.6.2. Гормоны надпочечников	38
1.6.3. Место надпочечников в общем метаболизме меди у млекопитающих ..	41
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	44
2.1. Оборудование	44
2.2. Материалы	45
2.3. Лабораторные животные	47
2.4. Методы исследования	48
2.4.1. Экспериментальные методы.....	48
2.4.2. Компьютерные методы	61
2.4.3. Статистическая обработка результатов	61
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	62
3.1. Влияние адреналэктомии на метаболизм меди у крыс	62
3.1.1. Изменения статуса меди в сыворотке крови крыс после АЭ.....	62
3.1.2. Изменение концентрации меди в органах и субклеточных фракциях печени АЭ крыс	66
3.1.3. Влияние АЭ на распределение меди в цитозоле гепатоцитов.....	68
3.1.4. Исследование митохондриальной фракции гепатоцитов АЭ и контрольных крыс.....	77
3.1.5. Влияние АЭ на гетерогенность популяции митохондрий печени крыс ..	81

3.1.6. Исследование транскрипционной активности генов, кодирующих белки МСМ, в печени АЭ крыс	85
3.2. Характеристика метаболизма меди в надпочечниках	92
3.2.1. Концентрация меди в печени и надпочечниках крыс в период раннего постнатального развития	92
3.2.2. Статус меди в сыворотке крови крыс в период раннего постнатального развития	96
3.2.3. Изменение профилей экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом меди, в течение онтогенеза.....	100
3.2.4. Содержание белков, участвующих в метаболизме меди, в печени и надпочечниках крыс в течение раннего онтогенеза	108
3.2.5. Схемы метаболизма меди в гепатоцитах и надпочечниках крыс.....	111
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
5. ВЫВОДЫ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААС – атомная абсорбционная спектроскопия

АГ – аппарат Гольджи

АКТГ – адренкортикотропный гормон

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

АЭ – адреналэктомия

АЭ-крысы – адреналэктомированные крысы

ВТММ – взрослый тип метаболизма меди

ГФИ-ЦП – церулоплазмин, связанный с мембраной через гикозилфосфатидилинозитоловый якорь

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТТ – дитиотреитол

ЛО-крысы – ложнооперированные крысы

МСМ/ТСМ – метаболическая/транспортная система меди

МТ – металлотионеин

МЭ – β -меркаптоэтанол

н.п. – нуклеотидная пара

НЦМ – нитроцеллюлозная мембрана

ПААГ – полиакриламидный гель

СОД – супероксиддисмутаза

ЦП – церулоплазмин

ЦО – цитохром *c* оксидаза

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭТММ – эмбриональный тип метаболизма меди

АТР7А/АТР7В – соответственно АТФаза Менкеса и АТФаза Вильсона

РАМ – пептидилглицин α -амидирующая монооксигеназа

PBS – фосфатно-солевой буфер

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

По классификации элементов живого медь входит в группу микроэлементов и является одновременно обязательным компонентом всех организмов и токсическим агентом. Незаменимость меди для млекопитающих обусловлена тем, что она является каталитическим и структурным ко-фактором ферментов, контролирующих базовые метаболические процессы аэробов (*Tapiero et al., 2003*). Осуществление каталитических функций меди связано с изменением состояния окисления $\text{Cu(I)} \leftrightarrow \text{Cu(II)}$. Активные центры купроэнзимов имеют высокоаффинные сайты связывания атомов меди с большим координационным числом. Они прочно удерживают медь в обоих состояниях окисления (*Rubino and Franz, 2012*). Вне координационных сфер ионы меди индуцируют образование свободных радикалов кислорода, которые, действуя подобно ионизирующему излучению, вызывают окислительный стресс (*Kozlowski et al., 2014*). Из внеклеточной среды к местам формирования купроэнзимов медь безопасно доставляется с помощью медь-транспортных белков. Они принадлежат различным семействам, относятся к интегральным мембранным, или растворимым, белкам, расположены в плазматической мембране, цитозоле, митохондриях, аппарате Гольджи, лизосомах (*Nevitt et al., 2012*). Медь-транспортные белки содержат разнообразные Cu(I) -связывающие мотивы: с маленьким и большим координационным числом, с высокой и низкой аффинностью, с различной комбинацией лигандов. Каждый из них удерживает атом меди, но при локальном изменении окислительно-восстановительного потенциала или pH среды, в присутствии другого транспортера меди в апо-форме или апо-купроэнзима, атом меди может быть легко передан. Передача меди происходит при прямом специфическом взаимодействии транспортеров в направлении снижения энергии связывания. Медь, теряемая в результате врожденных дефектов транспортеров или активных центров купроэнзимов,

аккумулируется в клетках и провоцирует развитие онкологических и нейродегенеративных заболеваний (*Gaggelli et al., 2006*).

Биологическая роль меди не ограничивается участием в биокатализе. Внутриклеточные и внеклеточные локальные изменения концентрации меди контролирует сигнальные пути (*Mufti et al., 2007; Turski et al., 2012; Ioannoni et al., 2012; Bartuzi et al., 2013*), модулируют работу рецепторов эндотелиального фактора роста, γ -аминомасляной кислоты и глутамата, способствуют работе потенциал-управляемого Ca(II)-канала (*Finney et al., 2007; Gaier et al., 2013*). Таким образом, медь можно отнести к вторичным мессенджерам. Выполнение этой функции требует двух условий: (1) существование медь-регулируемых сенсоров и (2) наличие пула меди, который аккумулирует и легко освобождает ее. У млекопитающих к медь-регулируемым сенсорам относятся транскрипционный фактор Sp1 (*Liang et al., 2012*) и семейство лизилоксидаза-подобных белков (LOXL1-4), дисбаланс функции которых приводит к ускорению роста опухолей (*Nishioka et al., 2012*). Контроль над локальными изменениями концентрации внутриклеточной меди обеспечивает (металлотионеин/глутатион/COMMD1)-система, которая связывает медь и затем распределяет ее между купроэнзимами, депонирует, или способствует выведению (*Vasak and Meloni, 2011; Fedoseienko et al., 2014*). Изменение уровня содержания меди во внеклеточной среде зависит от активности гена церулоплазмينا в печени – центральном органе метаболизма меди: вся абсорбированная в кишечнике медь поступает в печень, в ней включается в секреторный церулоплазмин или выводится через желчь. Периферические органы, нуждающиеся в меди, через факторы, природа которых остается не известной, индуцируют освобождение меди из печени в кровоток (*Kim et al., 2010; Babich et al., 2013*). С другой стороны, немногочисленные данные литературы показывают, что адреналэктомия задерживает экскрецию меди в желчь (*Gregoriadis and Sourkes, 1970; Prohaska et al., 1988; Fields et al., 1991*), и, возможно, медь в надпочечники поступает по механизму, сходному с таковым в печени (*Hanson et al., 2001; Zatulovskiy et al., 2012*). Эти факты позволяют предположить, что надпочечники контролируют метаболизм меди в

печени, однако, сведения о метаболизме меди в самих надпочечниках отсутствуют. Изучение метаболизма меди в них и влияние адреналэктомии на молекулярно-генетические механизмы, контролирующие баланс меди в печени, является вкладом в общее понимание механизма, поддерживающего гомеодинамику меди в организме млекопитающих.

Цель

Целью настоящего исследования было изучение влияния, оказываемого надпочечниками на метаболизм меди в печени, и особенностей метаболизма меди в печени и надпочечниках в течение постнатального развития.

Задачи

1. Оценить изменение показателей статуса меди в сыворотке крови крыс после проведения адреналэктомии (АЭ).
2. Сравнить метаболизм меди в печени контрольных и адреналэктомированных крыс: определить концентрацию и внутриклеточное распределение меди в гепатоцитах, оценить активность генов медьтранспортных белков и купроэнзимов на уровне транскрипции, трансляции и ферментативной активности.
3. Изучить особенности эмбрионального типа метаболизма меди и его переключения на взрослый тип в печени крыс.
4. Охарактеризовать метаболизм меди в надпочечниках крыс на разных сроках онтогенетического развития.

Научная новизна

Представлена детальная характеристика метаболизма меди в организме АЭ крыс. Показано, что АЭ не вызывает изменения уровня экспрессии генов, ассоциированных с обменом меди, но приводит к повышению показателей статуса меди в сыворотке крыс, накоплению меди в печени, а также перераспределению меди между клеточными компартментами гепатоцитов. В

результате нарушается металлизирование купроэнзима СОД1, увеличивается нагрузка медью белка МТ, выполняющего функцию клеточного депо меди. АЭ влияет на метаболизм меди в митохондриях, приводя к изменению общего протеома. Показана неоднородность популяции митохондрий в клетке. Выделена и очищена фракция митохондрий, седиментирующая с ядерной фракцией. В результате АЭ в данной фракции митохондрий происходит снижение отношения мтДНК/СОХ4.

В работе показано, что накопление меди в гепатоцитах крыс в период эмбрионального типа метаболизма меди начинается в ядрах, однако после 5-го дня жизни основная часть меди переносится в митохондриальную фракцию. Метаболизм меди в печени новорожденных крыс, по сравнению с взрослыми животными, характеризуется низкой активностью генов *Ctrl*, *Cp*, *Ccs*, отсутствием экспрессии гена *Atp7b*, ген *Mt1a* экспрессируется активно.

В надпочечниках концентрация меди сразу после рождения начинает снижаться, и уже к 5-му дню жизни содержание меди достигает значения, характерного для взрослых животных. Экспрессия генов медьтранспортных белков и купроэнзимов соответствует таковой для клеток негепатоцитарных рядов: и у новорожденных, и у взрослых крыс активен только ген *Atp7a*, но не *Atp7b*, активна экспрессия гена *Ctrl*, ген *Cp* экспрессируется, но продуцируется лишь мРНК, кодирующая сплайс-изоформу ЦП (ЦП, заякоренный в мембрану через гикозилфосфатидилинозитоловый якорь (ГФИ-ЦП)).

Теоретическая и практическая значимость работы

Описанные изменения метаболизма меди в организме АЭ крыс подтверждают предположение о том, что надпочечники играют важную роль в регуляции метаболизма меди в печени, а значит, и в целом организме. Также были получены результаты, показывающие особенности метаболизма меди в печени и надпочечниках на ранних этапах онтогенетического развития. Изучение механизмов, лежащих в основе этих процессов, представляется важной фундаментальной задачей. Даже незначительное нарушение в экспрессии генов

медь-связывающих белков приводит к развитию тяжелых заболеваний (опухолевый рост, нейродегенерация, диабет, остеопороз и др.), знания о метаболизме меди в отдельных органах и его специфическом изменении в течение онтогенеза являются важными для установления этапов, нарушения в которых могут приводить к развитию патологических процессов. Кроме того, полученные данные в дальнейшем могут способствовать выяснению причин повышения концентрации меди в печени и повышения уровня церулоплазмينا в крови при некоторых патологических состояниях, как, например, при росте опухолей.

Методология и методы исследования

Исследование выполнено на лабораторных грызунах с применением современных методов биохимии и молекулярной биологии: ОТ-ПЦР, ПЦР, электрофорез в ПААГ и агарозном геле, иммуноэлектрофорез, двумерный электрофорез, иммуноблотинг, определение активности ферментов спектрофотометрически и в геле, хроматография, иммунопреципитация, дифференциальное центрифугирование, равновесное ультрацентрифугирование, спектрофотометрическое определение концентрации общего белка и РНК, атомно-абсорбционная спектрометрия. Используются методы компьютерного анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. Надпочечники влияют на метаболизм меди в печени. У АЭ крыс происходит повышение содержания ЦП и уровень его (ферр)оксидазной активности в сыворотке крови. В гепатоцитах увеличивается общая концентрация меди, однако ее содержание в митохондриях снижается, изменяется металлирование цитозольных и секреторных купроэнзимов, изменяется протеом митохондрий.
2. В период эмбрионального типа метаболизма меди (ЭТММ) медь, аккумулированная в печени, перераспределяется между ядром и митохондриями. Перераспределение меди между органеллами не

сопровождается изменением профиля или уровнем активности генов, участвующих в обмене меди. У новорожденных активность генов *Ctrl* и *Ccs* полностью подавлена, однако относительный уровень СОД1-мРНК, белка СОД1 и ферментативная активность СОД1 у новорожденных лишь на 30% ниже, чем у взрослых. Следовательно, у крыс в период ЭТММ, в отличие от взрослых, металлирование СОД1 осуществляется без участия CTR1/CCS комплекса. Переключение на взрослый тип метаболизма меди (ВТММ) сопровождается изменением профиля (репрессируется ген *Atp7a* и активируется ген *Atp7b*) и уровня активности (активность генов *Cp*, *Ctrl* и *Ccs* повышается, активность генов *Mt1a* понижается) генов метаболизма меди.

3. В процессе постнатального онтогенеза профиль и активность генов метаболизма меди в надпочечниках не претерпевает значительных перестроек. Метаболизм меди сходен с таковым в клетках негепатоцитарных рядов.

Степень достоверности и апробация результатов

Данные были получены при помощи разнообразных экспериментальных подходов, релевантным поставленным задачам, на репрезентативных группах животных. Результаты экспериментов характеризовались воспроизводимостью, они были подвергнуты статистической обработке.

Результаты исследования были доложены на российских и международных конференциях: 15-ая Пушинская международная школа-конференция молодых ученых “Биология – наука 21 века” (Пушино, 2011), 11th International Symposium of Metal Ions in Biology and Medicine (Кембридж, Великобритания, 2011), 16-ая Пушинская международная школа-конференция молодых ученых “Биология – наука 21 века” (Пушино, 2012), 8th International Copper Meeting “Copper in Biology” (Альгеро, Италия, 2012), International Workshop on Human Disorders of Copper Metabolism: Recent Advances and Main Challenges (Балтимор, США, 2013), Молодежная научная конференция в рамках Политехнического молодежного

фестиваля науки (Санкт-Петербург, 2013), 38th FEBS Congress 2013 “Mechanisms in Biology” (Санкт-Петербург, 2013), 42-ая Теоретическая и практическая конференция с международным участием “Неделя науки в СПбГУ” (Санкт-Петербург, 2013), The FEBS EMBO 2014 Conference (Париж, Франция, 2014), 4-ый Съезд физиологов СНГ “Физиология и здоровье человека” (Сочи – Дагомыс, 2014).

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Биологическая роль меди

1.1.1. Купроэнзимы

У млекопитающих число купроэнзимов значительно меньше, чем ферментов, содержащих в качестве ко-факторов ионы железа или цинка. Однако их роль в метаболизме так значительна, что по биологическому значению медь не уступает ни цинку, ни железу. Список основных купроэнзимов млекопитающих приведен в таблице 1.1. Он свидетельствует, что купроэнзимы контролируют базовые процессы клетки. Так, они составляют часть антиоксидантной системы ($\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -супероксиддисмутаза, СОД1 и СОД3), участвуют в окислительном фосфорилировании (цитохром-*c*-оксидаза, ЦО), контролируют пост-трансляционное созревание нейропептидов (пептидилглицин α -гидроксилирующая монооксигеназа, ПМГ), синтез нейромедиаторов (допамин- β -гидроксилаза, ДБГ) и меланина (тирозидаза), формирование соединительной ткани (лизилоксидаза). Важную роль в двунаправленном транспорте железа играют купроэнзимы семейства голубых мультимедных оксидаз – церулоплазмин, гефестин и циклопен.

Таблица 1.1.

Основные купроэнзимы млекопитающих, их функции, а также нарушения, вызываемые их дефицитом.

Купроэнзимы	Локализация	Основные функции	Основной продуцирующий орган	Нарушения, вызываемые дефицитом
1	2	3	4	5
Секреторный церулоплазмин (ЦП, ферроксидаза)	Кровь, СМЖ, молоко, и другие внеклеточные жидкости	Окисление $\text{Fe(II)} \rightarrow \text{Fe(III)}$ при встраивании железа в апо-трансферрин; окисление аминов, транспорт меди	Печень, молочная железа	Ацерулоплазминемия (характеризуется клинической триадой: ретинобластома, сахарный диабет, неврологические расстройства)

1	2	3	4	5
ГФИ-ЦП* (сплайс-изоформа ЦП, закоренная в мембране)	Плазматическая мембрана клеток негепатоцитарного ряда	Окисление Fe(II)→Fe(III) при мобилизации Fe(II) из клетки	Мозг, семенники	Нарушение метаболизма железа
Гефестин (ЦП-подобный белок, ферроксидаза)	Плазматическая мембрана	Транспорт пищевого железа в кровотоки	Энтероциты	X-сцепленная анемия
Циклопен (ЦП-подобный белок, ферроксидаза)	Внутриклеточные мембраны	Транспорт железа из плаценты к плоду	Плацента	Медь-зависимая анемия плода
СОД1 (Cu ²⁺ /Zn ²⁺ -супероксиддисмутазы)	Цитозоль, ядерный матрикс, лизосомы, пероксисомы, митохондрии	Диспропорционирует два супероксидных аниона в кислород и перекись водорода	Все клетки	Окислительный стресс, семейная форма АЛС** (2% больных АЛС)
СОД3 (Cu ²⁺ /Zn ²⁺ -супероксиддисмутазы)	Внеклеточные жидкости (кровь, склера и др.)	То же	Сосуды, легкие, плацента и другие	То же
Цитохром-с-оксидаза (ЦО)	Внутренняя мембрана митохондрий	Переносит электроны от цитохрома с на O ₂ , перекачивает протоны в межмембранное пространство	Все клетки	Дефицит АТФ и снижение всех функций организма
Протеинлизин-6-оксидаза (лизилоксидаза)	Внеклеточный матрикс	Дезаминирует R-группы остатков лизина в тропоколлагене и тропоэластине, обеспечивая образование ковалентных сшивок между субъединицами этих белков	Фибробласты	Дефекты сосудов, костей, хрящей, сухожилий
Пептидилглицин α-гидроксилирующая монооксигеназа (РНМ)	Везикулы, мембраносвязанная и растворимая формы	Амидирует C-концевой глицин в нейропептидах, образующихся из их предшественников	Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система	Снижение продукции энкефалинов, множественные нарушения систем организма
Дофамин-β-гидроксилаза (ДБГ)	Везикулы, мембраносвязанная и растворимая формы	Превращает диоксифенилаланин (ДОПА) в норадреналин	Мозг	Нейрологические дефекты, гипотермия, гипотензия
Тирозиназы (фенол оксидазы)	Меланосомы	Синтез меланина из тирозина	Мозг, кожа	Депигментация, нарушение нейрогенеза

*ГФИ – гликозилфосфатидилинозитоловый якорь; **АЛС – амиотрофический латеральный склероз.

Церулоплазмин (ЦП) – голубой белок сыворотки крови, связывающий до 95% сывороточной меди. ЦП является α -гликопротеином, состоящим из единственной полипептидной цепи, содержащей 1046 аминокислотных остатков. Молекулярный вес белка составляет около 132 кДа, однако может варьировать в зависимости от состава углеводных компонентов (*Koschinsky et al., 1986*). Процесс созревания белка в гепатоцитах включает посттрансляционное N-гликозилирование, в результате которого ЦП получает три олигосахаридные цепи, содержащие остатки сиаловых кислот. Две из этих цепей являются двухантенными и одна трехантенной. Клонирование и сравнительная характеристика первичной структуры ЦП человека, крысы и мыши показала, что их аминокислотные последовательности совпадают на 90% (*Fleming and Gitlin, 1990*). Гликозилирование не является необходимым для встраивания атомов меди в молекулу ЦП, однако играет роль в обороте белка в организме, а также в осуществлении ферментативной активности (*Healy and Tipton, 2007*).

Молекула ЦП содержит шесть сайтов для связывания меди. Атомы меди типа I связываются тринуклеарным кластером, располагающимся между доменами 1 и 6 и составленным сайтами связывания меди доменов 2, 4 и 6. Перенос заряда между содержащими серу остатками цистеина и атомами меди в данном кластере обеспечивает поглощение при 610 нм, благодаря чему раствор ЦП приобретает характерное голубое окрашивание (*Calabrese et al., 1989*). Данный участок, связывающий три атома меди, важен не только для каталитической активности фермента, но также и для поддержания стабильности его структуры (*Vachette et al., 2002*). Кроме того, вблизи сайтов связывания меди доменов 4 и 6 располагаются также сайты, ответственные за связывание железа (*Quintanar et al., 2004*). Второй тринуклеарный центр молекулы ЦП сформирован одним сайтом связывания меди типа II, а также двумя сайтами, координирующими медь типа III (*Calabrese et al., 1989*).

Основным местом синтеза ЦП являются гепатоциты, однако он происходит также в селезенке, легких, яичниках и мозге (*Fleming and Gitlin, 1990*). В дополнение к 6 тесно связанным атомам меди молекула новосинтезированного

ЦП содержит также лабильные атомы меди, которые ЦП транспортирует к клеткам других органов, нуждающихся в меди. Было показано, что примерно 10% сывороточного ЦП взрослого человека представлено формой апо-ЦП, не обладающей ферментативной активностью (*Hellman and Gitlin, 2002*).

Роль ЦП в организме не ограничивается его медь-транспортной функцией. ЦП является также белком острой фазы, при воспалении его содержание в сыворотке крови возрастает в 2 – 3 раза (*Healy and Tipton, 2007*). Кроме того, ЦП является оксидазой, осуществляющей окисление широкого спектра субстратов, включая биогенные амины, некоторые фенолы, липопротеины низкой плотности, гормоны и нейромедиаторы (*Young and Curzon, 1972; Mukhopadhyay et al., 1997; Zaitsev et al., 1999*).

ЦП играет также важную роль в метаболизме железа, что было впервые показано в эксперименте, проведенном на свиньях, получавших недостаточное количество пищевой меди. У животных развивалась анемия, связанная с дефицитом железа, которая могла быть скорректирована только введением меди, в то время как увеличение количества железа в пище не оказывало эффекта (*Lee et al., 1968; Roeser et al., 1970*). Кроме того, исследования, показавшие, что перфузированная печень собаки отвечает на введение холо-ЦП высвобождением ионов железа из гепатоцитов, подтвердили роль ЦП как важнейшей феррооксидазы (*Osaki et al., 1971*). Феррооксидазная функция ЦП заключается в окислении ионов Fe(II), экскретированных из клеток печени белком ферропортином, единственным известным экспортером железа у человека. ЦП осуществляет окисление Fe(II) до ионов Fe(III), которые способен связывать трансферрин, основной переносчик железа в плазме крови (*Harris, 2003; De Domenico et al., 2007; Vashchenko and MacGillivray, 2013*). Помимо ЦП феррооксидазной активностью обладают также белки гефестин и циклопен. Гефестин осуществляет окисление железа в энтероцитах, способствуя переносу пищевого железа в кровотоки, в то время как циклопен наиболее активен в трофобластах плаценты, обеспечивая поступление ионов железа от матери к развивающемуся плоду (*Vashchenko and MacGillivray, 2013*).

Мутации в гене *Cp*, кодирующем ЦП, приводят к развитию аутосомно-рецессивного заболевания ацерулоплазминемии (Harris, 2003). Наиболее серьезным физиологическим дефектом при данном заболевании является отсутствие холо-ЦП, обладающего ферментативной активностью. У пациентов наблюдается накопление железа в различных органах, включая печень, поджелудочную железу, мозг, что в долгосрочной перспективе приводит к развитию диабета, дегенерации сетчатки и неврологическим нарушениям (Harris et al., 1995; Xu et al., 2004; Vassiliev et al., 2005).

Медь-зависимая **цитохром-с-оксидаза (ЦО)** является терминальным участником цепи переноса электронов во всех аэробных клетках – комплекс IV дыхательной цепи. Он располагается на внутренней мембране митохондрий эукариот, а также встроен в плазматическую мембрану многих прокариотических клеток (Mason, 1979; Popovic, 2013). В активном центре белка происходит восстановление молекулярного кислорода до воды. Образовавшуюся в ходе окислительно-восстановительной реакции свободную энергию ЦО использует для переноса протонов через мембрану, формируя электрохимический протонный градиент, необходимый для синтеза АТФ (Antonini et al., 1970; Wikstrom, 1977; Hosler et al., 2006).

Опираясь на результаты кристаллографических исследований, до недавнего времени считали, что эукариотическая ЦО состоит из 11 – 13 полипептидных субъединиц: 11 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, 13 у млекопитающих (Tsukihara et al., 1995; Tsukihara et al., 1996; Fontanesi et al., 2008). Однако в 2012 году исследование, проведенное Balsa с соавторами, показало, что белок NDUFA4, считавшийся ранее компонентом NADH-дегидрогеназного комплекса дыхательной цепи (Carroll et al., 2006), на самом деле является частью комплекса ЦО (Balsa et al., 2012). Авторы отмечают, что следов NDUFA4 не было выявлено в кристаллографических исследованиях комплекса ЦО, и предполагают, что потеря этого белка происходит в процессе очистки белкового комплекса при подготовке к выращиванию кристаллов.

Субъединицы COX1, COX2 и COX3 комплекса ЦО млекопитающих представлены крупными гидрофобными трансмембранными белками, которые кодируются митохондриальным геномом (*Fontanesi et al., 2008*). Они образуют каталитический центр фермента, в состав которого входят сайты связывания металлов. Медь и гем А, уникальный гем, обнаруженный исключительно в составе ЦО, формируют три окислительно-восстановительных центра: CuA центр в составе субъединицы COX2 и CuB/гем А3 бинуклеарный центр в субъединице COX1. Оставшиеся субъединицы – небольшие белки, кодирующиеся ядерной ДНК. Они окружают каталитический центр фермента и служат для сборки и поддержания работоспособности комплекса, а также участвуют в защите каталитического центра от активных форм кислорода (АФК).

Дефицит ЦО является наиболее распространенной причиной митохондриальных энцефалопатий – гетерогенной группы заболеваний, характеризующихся нарушением аэробного дыхания. Большая часть генетических дефектов ЦО вызвана мутациями ядерных генов, и все они связаны с процессом сборки комплекса. Это мутации генов, кодирующих факторы SCO1 и SCO2, необходимые для встраивания меди в субъединицу COX2; COX10 и COX15, участвующие в биосинтезе гема А; SURF1, фактор ранних этапов сборки, и другие (*Pecina et al., 2004; Fontanesi et al., 2008*). Белок COX17 необходим для доставки ионов меди в митохондрии к комплексу ЦО. Мыши с нокаутом гена, кодирующего этот белок, не были способны сформировать работающий комплекс, что приводило к гибели эмбрионов на 8.5 – 10 день внутриутробного развития (*Takahashi et al., 2002*).

Супероксиддисмутазы (СОД) – семейство белков, осуществляющих дисмутацию супероксид-радикала до перекиси водорода и молекулярного кислорода. СОД являются основным компонентом антиоксидантной защиты организма, нейтрализующей постоянно образующиеся АФК. Известно, что дрозофилы, а также микроорганизмы, лишенные СОД, являются более уязвимыми к действию АФК (*Linder, 2001*).

У млекопитающих известны следующие изоформы белка: цитоплазматическая Cu/Zn-SOD1 (СОД1), митохондриальная Mn-SOD (СОД2) и внеклеточная секреторная Cu/Zn-SOD (СОД3). Первое описание супероксиддисмутазной активности у белка, известного ранее как эритрокупреин (у человека) или гемокупреин (у быка), было сделано в 1969 году (*McCord and Fridovich, 1969*). Авторы показали, что СОД1 содержит атомы меди, необходимые для его функциональной активности. СОД1 является очень стабильным гомодимерным белком с молекулярной массой 32 кДа. Он встречается преимущественно в цитоплазме клеток, но был обнаружен также в ядре и пероксисомах (*Crapo et al., 1992*). В печени крыс СОД1 был также обнаружен в межмембранном пространстве митохондрий (*Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001*). Каждый мономер СОД1 содержит каталитический ион меди, а также ион цинка, необходимый для формирования устойчивой структуры белка (*Rakhit and Chakrabartty, 2006*). Мутации в гене *Sod1*, кодирующем белок СОД1, приводят к развитию семейного амиотрофического латерального склероза (АЛС). Это нейродегенеративное заболевание, связанное с агрегацией мутантного СОД1 в цитоплазме клеток и приводящее к гибели моторных нейронов коры, ствола мозга и спинного мозга (*Rosen et al., 1993; Johnston et al., 2000; Stathopoulos et al., 2003*). Кроме того, СОД1 необходима для поддержания функционирования нервно-мышечных контактов в конечностях. Нокаут гена *Sod1* у мышей приводит к развитию хронической периферической нейропатии, затрагивающей в первую очередь аксоны моторных нейронов в дистальных отделах конечностей (*Flood et al., 1999*). Физиологическая моторная недостаточность у людей проявляется уже в возрасте 6-7 месяцев.

Доставку иона меди к СОД1, а также встраивание металла в активный центр фермента осуществляет специфический шаперон CCS (Copper Chaperone for SOD1) (*Culotta et al., 1997; Culotta et al., 2006*). Дефицит пищевой меди у грызунов вызывает снижение содержания белка и уровня активности СОД1. В то же время, уровень CCS возрастает в печени, почках, сердце и даже в мозге, где уровень СОД1 остается неизменным. То есть, изменение содержания CCS связано

с изменением статуса меди, но не зависит прямо от содержания СОД1 (*Prohaska et al., 2003*). Таким образом, уровень белка CCS может быть использован для оценки статуса меди у млекопитающих.

Внеклеточная $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -супероксиддисмутаза (СОД3) представляет собой 135 кДа гомотетрамер (*Marklund et al., 1982*). В составе белка выделяют три функциональных домена: участок N-гликозилирования, повышающий растворимость СОД3, активный сайт, на 50% гомологичный СОД1, и гепарин-связывающий домен, участвующий в связывании с гепарансульфат протеогликанами, происходящем на поверхности клеток и во внеклеточном пространстве (*Hjalmarsson et al., 1997*). Было показано, что у человека ген *Sod3* активно экспрессируется в легких, кровеносных сосудах, дыхательных путях, коже, почках, матке и сердце (*Hendrickson et al., 1990; Kwon et al., 2012*).

Пептидилглицин α -амидирующая монооксигеназа (РАМ) – купроэнзим, функцией которого является α -амидирование предшественников многих пептидных гормонов до биологически активных форм (*Eipper et al., 1983*). Фермент РАМ состоит из двух каталитических доменов: пептидилглицин α -гидроксилирующей монооксигеназы (PHM) и лиазы (PAL). В состав PHM входит ион меди. Этот домен катализирует гидроксилирование глицина, находящегося на С-конце многих неактивных форм нейропептидов. На следующем этапе созревания гормона PAL последовательно гидролизует гидроксилированный пептид, продуцируя амидированный пептид (*Eipper et al., 1992; Klinman, 2006*). РАМ участвует в посттрансляционной модификации многих важных нейропептидов, включая окситоцин, вазопрессин, адренкортикотропный гормон, вазоактивный интестинальный пептид, вещество P, нейропептид Y, холецистокинин, гастрин, и многие другие (*Eipper et al., 1992; Prohaska and Broderius, 2006*).

РАМ является преимущественно мембраносвязанным или везикулярным белком, однако он был обнаружен также в сыворотке крови в виде укороченной секретируемой формы белка, лишенной трансмембранного домена (*Eipper et al., 1985*). Ранее было показано, что *in vitro* биохимическая активность РАМ снижена

в тканях и сыворотке крови крыс с дефицитом меди (*Prohaska et al., 1995*). Исследование, выполненное на пациентах с болезнью Менкеса, предлагает использовать содержание РАМ в сыворотке крови как параметр для оценки статуса меди (*Prohaska et al., 1997*).

1.1.2. Транспортная система меди

Формирование холо-купроэнзимов полностью зависит от транспорта меди из окружающей среды к местам металлирования апо-купроэнзимов в клетке. Для этого медь должна быть перенесена через мембраны и растворимые пространства клетки (в случае с ЦО ионы меди преодолевают три мембраны и 2 растворимых пространства). Однако атомы меди, находящиеся вне координационных сфер, являются высокотоксичными агентами, так как способны катализировать реакции типа Фентена, в результате которых образуются активные метаболиты кислорода, действующие подобно радиационному облучению на все структуры клетки (*Yoshida et al., 1993*).

Проблему безопасного транспорта меди решает специальная система белков-переносчиков – транспортная система меди (ТСМ), являющаяся частью метаболической системы меди (МСМ). У млекопитающих ТСМ, с одной стороны, демонстрирует высокую консервативность и ее белки гомологичны белкам ТСМ всех филогенетических групп, с другой стороны, она состоит из самого большого числа участников, набор которых и уровень экспрессии характеризуются тканевой специфичностью и зависят от периода онтогенетического развития. Участники ТСМ млекопитающих приведены в таблице 1.2 и их работа показана на рисунке 1.1. Общим свойством этих белков является наличие медь-связывающего домена, включающего, как правило, мотив с двумя остатками цистеина (СХС, или СХХС), которые образуют двузубый кластер с координационным числом 2. Этот мотив с высокой аффинностью связывает Cu(I) . Общая длина домена может составлять несколько десятков аминокислотных остатков, состав которых и взаимное расположение в полипептидной цепи

определяют аффинность всего мотива и его способность принимать/передавать атом меди.

Табл. 1.2. Белки млекопитающих, участвующие во внутриклеточном перемещении меди

Белок	Основное место локализация, орган преимущественной экспрессии	Функция	Дефекты, развивающиеся вследствие утраты функции гена
1	2	3	4
CTR1 (высокоаффинный импортер меди), Cu ¹⁺ /K ¹⁺ -обменник	Плазматическая мембрана, все клетки	Связывает Cu ²⁺ во внеклеточном пространстве, предположительно восстанавливает Cu ²⁺ →Cu ¹⁺ , переносит Cu ¹⁺ в цитозоль без затраты энергии, контролирует морфогенез	Внутриутробная гибель гомозигот, дефицит купроэнзимов у гетерозигот
CTR2 (низкоаффинный транспортер меди)	Мембраны эндолизосом всех клеток	Переносит Cu ¹⁺ из эндолизосомального пространства в цитозоль	Нарушение транспорта железа
DMT1 (транспортер 2-валентных ионов)	Апикальный домен плазматической мембраны энтероцитов	Транспортирует Cu ²⁺ из ЖКТ в энтероциты	Снижение поступления в организм ионов 2-валентных металлов
CCS (Cu ¹⁺ -шаперон для СОД1)	Цитозоль всех клеток	Приобретает Cu ¹⁺ у CTR1 и встраивает его в апо-СОД1	Дефицит СОД1-активности
COX17 (Cu ¹⁺ -шаперон для ЦО)	Межмембранное пространство митохондрий	Переносит Cu ¹⁺ от CTR1 в митохондрии и передает его на интегральные белки внутренней мембраны митохондрий SCO1 и SCO2	Нарушение сборки ЦО, дефицит производства АТФ
SCO1 и SCO2	Внутренняя мембрана митохондрий	Встраивают медь в ЦО, контролируют баланс меди в клетке, осуществляют окислительно-восстановительный цикл Cu ²⁺ →Cu ¹⁺	Нарушение сборки ЦО, дефицит производства АТФ
НАН1 (или АТХ1, или АТОХ1, Cu ¹⁺ -шаперон для медьтранспортных АТФ-аз)	Цитозоль всех клеток	Переносит Cu ¹⁺ от CTR1 к цитозольным медь-связывающим мотивам Cu-транспортных АТФ-аз; компонент антиоксидантной системы цитозоля	Ранняя пренатальная гибель, отставание в росте

1	2	3	4
АТР7А (АТФ-аза Менкеса, $\text{Cu}^{1+}/\text{Cu}^{2+}$ -транспортирующая АТФ-аза Р1 типа)	Мембраны транс-сети Гольджи, все клетки, исключая гепатоциты взрослых млекопитающих	Принимает ионы Cu^{1+} от НАН1, переносит их в цистернальное пространство комплекса Гольджи, окисляя до Cu^{2+} , и встраивает их в активные центры купроэнзимов в комплексе Гольджи, но не в секреторный ЦП; участвует в экскреции меди из клеток	Пренатальная и ранняя постнатальная гибель, гипопигментация, нарушение формирования синапсов, соединительной ткани, ломкие и закрученные волосы. Ярко выраженный дефицит купроэнзимов, особенно приобретающих медь в секреторном пути клетки (болезнь Менкеса)
АТР7В (АТФ-аза Вильсона, $\text{Cu}^{1+}/\text{Cu}^{2+}$ -транспортирующая АТФ-аза Р1 типа)	Мембраны транс-сети Гольджи, гепатоциты взрослых млекопитающих, молочная железа, некоторые отделы мозга	Принимает ионы Cu^{1+} от НАН1, переносит их в цистернальное пространство комплекса Гольджи, окисляя до Cu^{2+} , встраивает их в активные центры секреторного ЦП, формирующегося в комплексе Гольджи; экскретирует медь в желчь	Болезнь Вильсона, накопление меди в клетках печени и мозга в токсических количествах; дефицит холо-ЦП, нарушение метаболизма железа

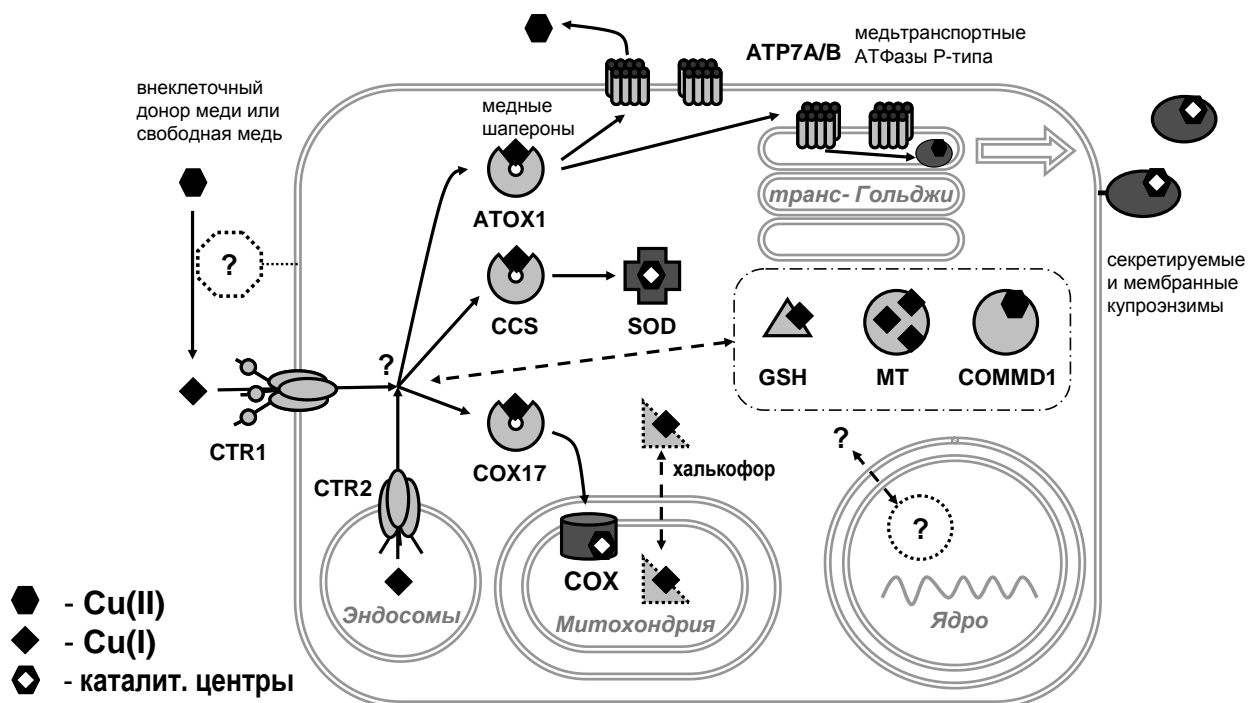


Рис. 1.1. Обобщенная схема транспортной системы меди (ТСМ) клеток позвоночных животных.

Заштрихованными фигурами изображены медь-транспортные белки, темно-серыми – купроэнзимы, светло-серым – известные медь-связывающие молекулы, роль которых в ТСМ точно не установлена. Пунктирной линией изображены гипотетические участники и пути ТСМ, молекулярная природа которых на данный момент не установлена. Путь обеспечения медью COX показан упрощенно. GSH – глутатион, MT – металлотioneин, COMMD1 – белок COMMD1/MURR1.

Белки-транспортёры, или Cu(I)-шапероны, образуют цепочки, по которым они, меняя холо-форму на апо-форму, при прямом взаимодействии передают Cu(I) друг другу в направлении повышения аффинности их медь-связывающих мотивов из внеклеточного пространства в различные компартменты клетки. Cu(I)-шапероны, которые встраивают медь непосредственно в апо-купроэнзимы, дополнительно содержат домены, связывающиеся с апо-формой этих ферментов. При общем сходстве механизма передачи меди между Cu(I)-шаперонами, они относятся к разным типам белков.

Белок **CTR1** (кодируется геном *Slc31a1*) является высокоаффинным трансмембранным импортером меди, обеспечивающим основной путь поступления меди в клетки всех типов. Впервые CTR1 был описан как медь-транспортный белок у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (Dancis et al., 1994). Было показано, что инактивация дрожжевого уCTR1 приводила к снижению импорта меди в клетки и развитию дефицита железа, вследствие низкого насыщения медью медь-зависимой ферроксидазы FET3. В 1997 году был выделен hCTR1 человека, белок, способный компенсировать утраченные функции в клетках дрожжей с нокаутированными уCTR1 и уCTR3 (Zhou and Gitschier, 1997). Кроме того, по гомологии с CTR1 авторами был также обнаружен и впервые клонирован белок **CTR2** (*Slc31a2*) – низкоаффинный транспортер, переносящий медь через мембрану. Для того, чтобы подтвердить участие CTR1 в импорте меди в клетках человека, клетки линии HEK293 были трансфецированы плазмидой, содержащей открытую рамку считывания гена *Ctrl* мыши под контролем цитомегаловирусного промотора. Импорт меди в клетки, суперпродуцирующие CTR1, возрастал в 3 – 7 раз по сравнению с вектор-трансфецированными контрольными клетками (Lee et al., 2002). Также было показано, что объем переноса меди через плазматическую мембрану зависит от внеклеточной концентрации меди.

Белок CTR1 экспрессируется в клетках большинства органов, но наиболее высокий уровень экспрессии у мышей наблюдается в печени, тонком кишечнике, сердце и почках (Lee et al., 2001; Kuo et al., 2006). Кроме того, синтез CTR1 увеличивается в клетках молочной железы во время беременности и в период

лактации. В клетке CTR1 преимущественно встроен в плазматическую мембрану, однако может находиться также в мембране внутриклеточных везикул (Wee *et al.*, 2013). При повышении уровня внеклеточной меди происходит быстрый эндоцитоз и последующая деградация CTR1 (Guo *et al.*, 2004). Факторами, способствующими увеличению количества белка CTR1, а также модулирующими его локализацию, являются гипоксия и низкий pH внеклеточной среды.

Мономер CTR1, состоящий из 190 аминокислотных остатков, представлен следующими доменами – внеклеточный N-концевой домен, три трансмембранных домена и цитозольный C-концевой домен (Рис. 1.2 А) (Kim *et al.*, 2008). Структурные исследования показали, что CTR1 функционирует в виде гомотримера (Рис. 1.2 Б), где его трансмембранные домены образуют канал, по которому ионы Cu(I) проходят сквозь билипидный слой (De Feo *et al.*, 2009).

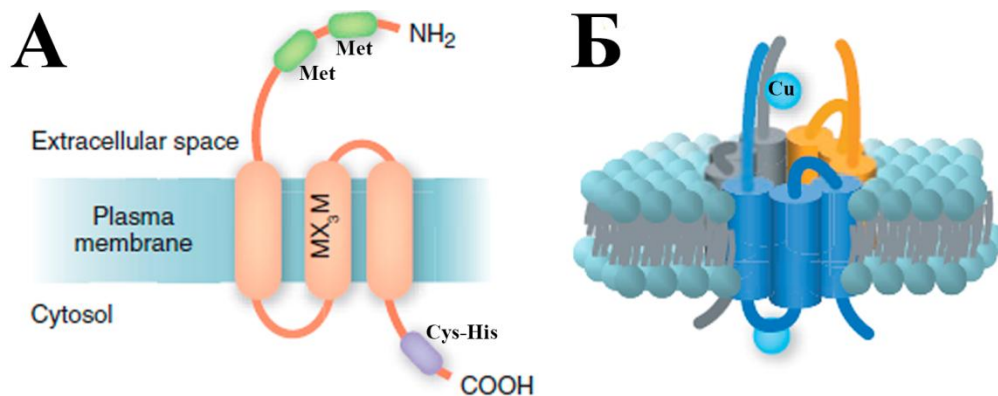


Рис. 1.2. Структурная модель CTR1 (Kim *et al.*, 2008).

А – мономер CTR1 человека содержит два богатых метионином внеклеточных домена, три трансмембранных домена, а также внутриклеточный домен, содержащий остатки цистеина и гистидина. **Б** – гомотример CTR1 в липидном бислое. Между субъединицами тримера формируется пространство с низкой электронной плотностью, по которому способны проходить ионы Cu(I).

Мультимеризация CTR1 стимулируется действием гормонов, таких как эстрогены, прогестерон, инсулин (Hardman *et al.*, 2006). N-концевой домен содержит два богатых метионином и гистидином участка, включающие мотив MX2M. Эти участки связывают медь и облегчают ее переход через канал (Puig *et al.*, 2002). Второй трансмембранный домен содержит аналогичный медь-связывающий мотив MX3M, необходимый для захвата ионов меди путем

формирования Cu-S связей. Цитозольный домен также содержит медь-связывающие мотивы, структуры которых отличаются у животных различных таксонов. Так, у дрожжей это богатые цистеином кластеры, а у позвоночных – консервативный мотив His-Cys-His (*Puig and Thiele, 2002*). Связывание меди белком CTR1 является процессом, зависимым от времени, температуры и значения pH (*Lee et al., 2002*).

Белок CTR1 осуществляет транспорт ионов меди в состоянии окисления Cu(I), но большая часть пищевой меди находится в состоянии Cu(II), т.е. для попадания внутрь клетки ион меди должен быть восстановлен. Внеклеточный лиганд, доставляющий медь к CTR1, а также механизм восстановления иона меди до сих пор неизвестны. Возможно, в этом процессе принимают участие неспецифические мембранные редуктазы семейства STEAP (*Ohgami et al., 2006*). Так, исследование редуктазы Steap3, проведенное на миелоидных клетках костного мозга, поддерживает предположение об участии этой редуктазы в восстановлении Cu(II) на плазматической мембране (*Knutson, 2007*).

Белок CTR1 играет важную роль в процессе эмбрионального развития, выступая как транспортер меди и как регулятор сигнальных путей клетки. Мышиные эмбрионы с генотипом *Ctrl^{-/-}* погибали, не способные к гастрюляции, в то время как у мышей *Ctrl^{+/-}* экспрессия CTR1 была снижена в два раза по сравнению с мышами *Ctrl^{+/+}* (*Lee et al., 2001; Kuo et al., 2006*). Нарушение сигнальных путей является важным признаком формирования и развития опухолей. Поскольку CTR1 принимает участие в регуляции сигнальных путей, он может быть мишенью для потенциальных средств химиотерапии. Кроме того, CTR1 является основным транспортером в клетку терапевтических препаратов на основе платины (*Ishida et al., 2002; Zatulovskiy et al., 2012*).

Белок CTR2 у млекопитающих располагается преимущественно во внутриклеточных мембранах клеток, таких как мембраны вакуолей, везикул, эндосом и лизосом, но его локализация может изменяться в зависимости от типа клеток и уровня содержания меди (*van den Berghe et al., 2007*). Небольшое количество белка может также располагаться на плазматической мембране клетки.

Гистологические исследования показали высокое содержание CTR2 в сердце и плаценте. Основной функцией CTR2 в клетках взрослых животных является рециклизация меди из внутриклеточных запасов (*Bertinato et al., 2008*). Было показано, что CTR2 структурно гомологичен второму трансмембранному домену белка CTR1, наиболее важному в процессе транспорта меди (*Zhou and Gitschier, 1997*).

Экскрецию меди из клеток выполняют белки *АТР7А* и *АТР7В*, принадлежащие к семейству АТФаз типа P_{1В}. Они используют энергию гидролиза АТФ для транспорта меди в восстановленной форме Cu(I) из цитозоля через клеточные мембраны, таким образом, вызывая снижение концентрации меди в цитозоле (*Arguello et al., 2007; Lutsenko et al., 2007*). Перенесенная через плазматическую мембрану медь может быть либо выведена из организма через желчь (в случае *АТР7В*), либо высвобождена в кровоток для последующего перераспределения в организме (в случае *АТР7А*). Однако АТФазы не присутствуют постоянно в составе клеточной мембраны (*Pase et al., 2004; Nyasae et al., 2007*), а транспортируют медь во внутриклеточные везикулы, которые в дальнейшем сливаются с клеточной мембраной, высвобождая медь. Медные АТФазы также осуществляют доставку меди к различным секреторным купроэнзимам, таким как ЦП, РАМ и другие (*Stevenson et al., 2003; Gupta and Lutsenko, 2009*). Процесс доставки меди и встраивания ее в активный центр фермента до конца не изучен. Так, апо-ЦП получает медь от *АТР7В*, причем высвобождаемая АТФазой медь встраивается в активный центр полностью сформированного фермента путем свободной диффузии (*Hellman et al., 2002*). В случае купроэнзима СОД3, получающего медь от *АТР7А*, взаимодействие транспортера и акцептора может стимулировать высвобождение меди из АТФазы и последующее встраивание в активный центр белка-акцептора (*Qin et al., 2006*).

АТР7А и *АТР7В* представляют собой мембранные белки с молекулярным весом 160 – 170 кДа. Они состоят из 8 трансмембранных сегментов и нескольких цитозольных доменов. N-концевой цитозольный домен содержит 6 сайтов для связывания меди. Оба белка располагаются на мембране транс-сети аппарата

Гольджи (транс-АГ), где получают медь от шаперона АТОХ1. Процесс передачи меди сопровождается гидролизом АТФ, что приводит к конформационным изменениям АТФаз, вследствие чего медь оказывается ориентированной в просвет АГ, либо его везикул. Под действием низкого рН происходит высвобождение меди, сопровождающееся возвращением АТФазы к изначальному состоянию (*Linz and Lutsenko, 2007*). Аминокислотные последовательности АТР7А и АТР7В гомологичны на 60%, что объясняет структурное и функциональное сходство этих белков.

Исследования на поляризованных эпителиальных клетках, а также клеточных линиях Сасо-2 и МДСК, показали, что в ответ на повышение уровня внутриклеточной меди, АТР7А мигрирует из транс-АГ к базолатеральной клеточной мембране, предположительно для экскреции меди в кровотоки (*Greenough et al., 2004; Monty et al., 2005*). В то же время, АТР7В мигрирует к апикальной мембране клетки, что необходимо для экскреции меди в желчь из гепатоцитов, либо в молоко из клеток молочной железы (*Roelofsen et al., 2000*).

Мутации в генах, кодирующих АТР7А и АТР7В, приводят к развитию болезни Менкеса и Вильсона, соответственно. При этом болезнь Менкеса характеризуется дефицитом меди, а болезнь Вильсона – ее накоплением (*Keen et al., 1998; Das and Ray, 2006; Gupta and Lutsenko, 2009; Huster, 2010*).

1.1.3. Гомеодинамика меди и медь-зависимый сигналинг

Известно, что медь принимает участие в процессах сигналинга. В цитозоле пулом “регуляторной меди”, то есть меди, которая рекрутируется для участия в процессах сигналинга, неоваскуляризации и опухолевой трансформации, может быть медь, связанная или с МТ (*Vasak and Meloni, 2011*), или с COMMD1 (*de Bie et al., 2005*). В таблице 1.3 представлены белки, принимающие участие в гомеодинамике меди и медь-зависимом сигналинге.

Таблица 1.3. Белки, контролирующие гомеодинамику меди или участвующие в медь-зависимом сигналинге

Белок	Локализация	Функция	Дефекты, развивающиеся вследствие его дефицита
Металлотионеины * (MT1 и MT2,)	Цитозоль всех организмов, митохондриальный матрикс, нуклеоплазма, сыворотка крови	Детоксицируют тяжелые металлы и АМК**, депонируют Cu^{1+} и Zn^{2+} и поддерживают их баланс, контролируют апоптоз, защищают клетки от гибели и неоплазии	Снижение содержания MT1 и MT2 ведет к нарушениям транскрипции, трансляции, продукции АТФ и др.
COMMD1* (белок метаболизма меди, кодируемый интроном гена MURR1)	Цитозоль и нуклеоплазма гепатоцитов и других клеток	Связывает ионы Cu^{2+} и экскретирует их через желчь, участвует в Cu-зависимом сигналинге и регуляции активности транскрипционного фактора NF-κB	Накопление меди в печени (медный токсикоз собак)
XIAP* (X-сцепленный ингибитор апоптоза)	Цитозоль	Ингибитор каспазы 3, убикитин-лигаза в отношении COMMD1, регулятор уровня меди в клетке	Дисбаланс контроля над клеточным циклом
SCO1/SCO2* (супрессоры нулевой мутации гена <i>Cox17</i>)	Внутренняя мембрана митохондрий	Принимают Cu^{1+} от COX17, участвуют в сборке ЦО, контролируют баланс меди	Нарушение сборки ЦО, дефицит АТФ
SCC* (маленький переносчик меди)	Кровь и моча	Экскретирует ионы меди из печени	Найден у больных болезнью Вильсона
халькофор* *** (переносчик меди)	Цитозоль, матрикс митохондрий	Транспортирует медь между цитозолем и митохондриями	Не описано
Sp1*	Цитозоль, ядро	Транскрипционный фактор, повышает активность гена CTR1 при низкой концентрации меди и понижает при накоплении меди в цитозоле	Нарушение гемопоеза, биогенеза митохондрий, созревания коллагена, неоваскуляризации
LOXP(1-4) * (лизилоксидазо-подобные белки)	Цитозоль, ядро	Транскрипционные факторы, контролируют активность генов, связанных с гомеодинамикой меди (супрессоры и активаторы роста опухолей и метастазирования)	Развитие опухолей, активация метастазирования
MAC1***	Цитозоль, ядро	Транскрипционный фактор, повышает активность гена CTR1 при низкой концентрации меди в клетке	Дефицит меди
ACE1***	Цитозоль, ядро	Транскрипционный фактор, повышает активность генов металлотионеина при высокой концентрации меди в клетке	Медный токсикоз

* обнаружены у млекопитающих; ** активные метаболиты кислорода; *** у млекопитающих не обнаружены, найдены у дрожжей.

Металлотхионеин (МТ) – низкомолекулярный (~7 кДа), богатый цистеином белок, способный связывать ионы металлов (*Pulido et al., 1966; Bremner and Davies, 1975; Palacios et al., 2011*). МТ является многофункциональным белком, играющим важную роль в поддержании гомеостаза меди и цинка, детоксикации тяжелых металлов, поддержании окислительно-восстановительного потенциала клетки, нейропротекции, регуляции клеточного цикла (*Hidalgo et al., 2001; Cherian and Kang, 2006; Maret, 2011*).

У млекопитающих выделяют четыре изоформы МТ. Мажорные изоформы МТ1 и МТ2 экспрессируются практически во всех органах и тканях, активность кодирующих их генов индуцируется различными факторами, такими как тяжелые металлы, провоспалительные цитокины, глюкокортикоиды, АФК (*Miles et al., 2000; Thirumoorthy et al., 2011*). Изоформа МТ3 синтезируется преимущественно в мозге, а МТ4 – в клетках многослойного эпителия, и указанные выше индукторы не оказывают влияния на экспрессию кодирующих эти изоформы генов (*Vasak and Meloni, 2011*). МТ является преимущественно цитозольным белком, но при определенных физиологических и патологических условиях он может быть обнаружен в ядре (*Kinningham et al., 1995; Nagano et al., 2000*). Кроме того, недавно было показано присутствие МТ в сыворотке крови, где он принимает участие в перераспределении тяжелых металлов в организме (*Lynes et al., 2006*).

МТ млекопитающих представляет собой полипептидную цепь, состоящую из 61 – 68 аминокислот, 20 из которых – остатки цистеинов, организованные в кластеры вида Cys–X–Cys, Cys–Cys и Cys–X–X–Cys, где X – любая аминокислота, кроме цистеина (*Kojima et al., 1976; Vasak and Meloni, 2011*). МТ содержит два домена, способных связывать металлы при помощи тиольной группы: N-концевой b-домен и a-домен, расположенный на C-конце. В клетке МТ присутствует как в апо-форме (тионеин), так и в связанном с металлом состоянии (*Petering et al., 2006*). При физиологических условиях МТ связывает преимущественно ионы меди и цинка, хотя все изоформы МТ способны образовывать комплекс с различными тяжелыми металлами (*Orlowski and Piotrowski, 1998; Vasak and*

Meloni, 2011). Одна молекула МТ может связать до 12 ионов Cu(I), либо до 7 ионов двухвалентного металла.

Экспрессия изоформ МТ1 и МТ2 индуцируется избыточным количеством меди в клетке через транскрипционный фактор МТF1 (metal transcription factor 1), который накапливается в ядре и связывается с MRE (metal responsive elements), расположенными в промоторных областях соответствующих генов (*Heuchel et al., 1994*). МТ принимает участие в поддержании клеточного гомеостаза меди, выполняя функцию внутриклеточного депо меди, в котором медь находится в состоянии окисления Cu(I). Известно, что глутатион может окислить медь, находящуюся в комплексе с МТ до Cu(II) и восстановить обратно до Cu(I) (*Kang, 2006*). Медь в степени окисления Cu(II) может быть связана белком COMMD1 (copper metabolism (Murr1) domain-containing protein 1), одной из функций которого является экскреция меди из клеток. При понижении концентрации меди в клетке Cu(I) высвобождается из связи с МТ и перераспределяется в соответствии с потребностями клетки, например, рекрутируется к местам формирования купроэнзимов (*Suzuki et al., 2002; Tapia et al., 2004*). Так, с помощью системы МТ-Cu(I)/глутатион/COMMD1-Cu(II) медь может быть выведена из клетки, восстановлена до Cu (I) и запасена в связанном с МТ виде или встроена в купроэнзимы (*Kang, 2006; Lindeque et al., 2010; Vasak and Meloni, 2011*). Количество запасаемой меди зависит от уровня меди вне клетки и может варьировать в широких пределах.

COMMD1 (*copper metabolism (Murr1) domain containing 1*) – многофункциональный белок, одной из важнейших функций которого является участие в поддержании гомеостаза меди в клетке. COMMD1 играет важную роль в экскреции меди из клетки, что подтверждается результатами кратковременного нокдауна COMMD1 в клетках линии НЕК293, приводившего к повышению уровня внутриклеточной меди (*Burstein et al., 2004*).

Для собак нескольких пород было описано заболевание, приводящее к нарушению запасаения меди – наследственный медный токсикоз собак. Было показано, что причиной развития медного токсикоза у Бедлингтонских терьеров

является делеция в гене *Commd1* (*van De Sluis et al., 2002*). В то же время, для других пород (скайтерьер, вест-хайленд-уайт-терьер, далматин, доберман и лабрадор-ретривер) лежащих в основе болезни мутаций не выявлено, что позволяет предположить, что в метаболизме меди у собак участвуют гены, не идентифицированные на данный момент времени. Заболевание характеризуется накоплением меди в печени, которое приводит к развитию воспаления и, в конечном итоге, к циррозу.

Недавние исследования показали, что COMMD1 может взаимодействовать с N-концевым медь-связывающим участком белка АТР7В, но не АТР7А (*Tao et al., 2003*). Данные позволяют предположить, что взаимодействие COMMD1 и АТР7В способствует выведению меди из гепатоцитов, а при мутации в гене *Commd1* подобное взаимодействие нарушается, что объясняет патофизиологию медного токсикоза собак.

Помимо поддержания гомеостаза меди, COMMD1 также участвует в регуляции водно-солевого обмена. В клетках эпителия он может связываться с δ -субъединицей натриевого канала, ингибируя активность этого канала (*Biasio et al., 2004*). Кроме того, COMMD1 специфически взаимодействует и подавляет активность транскрипционного фактора NF- κ B, регулирующего процессы апоптоза, клеточного цикла, механизмы врожденного и приобретенного иммунитета (*Ghosh et al., 1998; Baldwin, 2001*).

У пациентов с болезнью Вильсона, также характеризующихся накоплением меди в печени, не было выявлено мутаций в гене *Commd1*. Однако было показано, что гетерозиготность по молчащей миссенс-мутации в *Commd1* ассоциируют с ранним началом заболевания у пациентов с идентифицированными мутациями в гене *Atp7b* (*Stuehler et al., 2004*).

В работе *Burstein* с соавторами было показано, что содержание COMMD1 в клетке регулируется X-сцепленным ингибитором апоптоза (XIAP). XIAP убиквитинирует COMMD1, маркируя его для последующей деградации в протеасомах (*Burstein et al., 2004*). У *XIAP^{-/-}* мышей было отмечено пониженное содержание меди в фибробластах и клетках печени. Предположительно,

внутриклеточная концентрация меди не является фактором, регулирующим активность XIAP и запускающим медь-зависимую деградацию COMMD1, так как содержание COMMD1 в клетке остается постоянным при меняющихся концентрациях меди (*Klomp et al., 2003*).

1.2. Эмбриональный и взрослый типы метаболизма меди

Распределение меди в организме млекопитающих существенно изменяется в течение онтогенетического развития (*Mason, 1979*). В период пренатального развития медь поступает к плоду из организма матери через плаценту, что сопровождается повышением концентрации меди в плазме крови самки. Избыток поступившей меди может быть транспортирован обратно в организм матери через белок CTR1, расположенный на базальной мембране клеток плаценты (*Hardman et al., 2006*).

Кроме того, в период эмбрионального развития начинается накопление меди в печени плода (*Walravens, 1980*). Представленные данные свидетельствуют о том, что в организме плода существует механизм тонкой регулировки содержания меди, в то время как система белков, отвечающих за транспорт, запасание и экскрецию меди у взрослых млекопитающих, не достаточно развита. В результате нарушений плацентарного транспорта меди в организме развивающегося плода формируется дефицит меди, что, в свою очередь, приводит к недостатку функционально активных купроэнзимов (*Keen et al., 1998*). Так, при дефиците меди у овец наблюдается низкая активность ЦО в моторных нейронах красного ядра мозга, в результате чего развивается нейродегенерация (*Mills and Williams, 1962*), а также в печени и сердце, что приводит к недостаточному синтезу АТФ (*Weisenberg et al., 1980*).

Аккумуляция меди в печени продолжается и на ранних этапах постнатального онтогенеза (*Allen et al., 2006*). Так, в печени новорожденных содержится около 70% от общего количества меди в организме, при этом значительная часть меди в гепатоцитах связана с белком, который ранее называли митохондрокупреином, экспрессирующимся лишь в печени плодов и

новорожденных животных (*Porter et al., 1964; Porter, 1968*). Позднее было показано, что этот белок является ассоциированной с лизосомами изоформой МТ и способен связать не более 16% от общего количества меди в печени (*Hartmann and Weser, 1977*). В сыворотке крови новорожденных животных концентрации меди и медь-транспортного белка ЦП находятся на низком уровне. В организме новорожденных животных содержание меди контролируется путем регуляции ее поглощения в кишечнике. Так, у крыс, получавших молоко с высоким содержанием меди, наблюдалось удержание меди в кишечнике, в то время как концентрация меди в сыворотке крови не изменялась (*Varada et al., 1993; Bauerly et al., 2005*).

Метаболизм меди в печени плода и новорожденных млекопитающих, характеризующийся накоплением меди в печени, определяют как эмбриональный тип метаболизма меди (ЭТММ). У человека он длится приблизительно до 4-месячного возраста (*Walravens, 1980*), у крыс – до 13-го дня жизни (*Hurley et al., 1980*), после чего происходит переключение на взрослый тип метаболизма меди (ВТММ). Переход сопровождается перераспределением меди в организме. Наблюдается резкое снижение концентрации меди в печени, активация гена *Cp* приводит к повышению содержания ЦП и переносимой им меди в сыворотке крови. Кроме того, в печени происходит полное подавление активности генов, кодирующих АТР7А и “митохондрикупреин”, но в то же время индуцируется экспрессия *Atp7b*, вследствие чего избыток меди начинает выводиться из организма через желчь.

На ранних этапах постнатального онтогенеза источником пищевой меди для новорожденных является ЦП молока, синтезирующийся в клетках молочной железы (*Platonova et al., 2007*). Этот гликопротеин отличается от ЦП крови составом углеводных цепей, а также тем, что с ним связано большее количество атомов меди. Расчеты, учитывающие ежедневное увеличение объема потребляемого молока в первый месяц жизни и концентрацию меди, ассоциированной с ЦП, показали, что снижение концентрации ЦП в молоке на фоне увеличивающегося потребления молока поддерживает содержание меди в

рационе новорожденного на постоянном уровне (Пучкова и др., 1997). В то же время, при вскармливании детей молочными смесями аналогичные расчеты показывают, что новорожденный, начиная с 3-го дня жизни, получает прогрессивно нарастающий избыток меди (Жигулева и др., 1999). Можно предполагать, что начало прикорма и поступление в организм пищевой меди, не ассоциированной с ЦП молока, служит стимулом для переключения на ВТММ (Пучкова и др., 1997; Платонова и др., 2004; Платонова и др., 2005).

В организме взрослых животных, характеризующихся ВТММ, пищевая медь поглощается из желудочно-кишечного тракта энтероцитами тонкого кишечника, причем интенсивность поглощения зависит как от уровня поступающей меди, так и от возраста и пола животного (Johnson et al., 1992; Lonnerdal, 2008). Из энтероцитов медь поступает в кровоток, вступает в комплекс с альбумином, либо α 2-макроглобулином, после чего доставляется в печень. Вблизи плазматической мембраны гепатоцитов медь вступает во взаимодействие с гистидином (Moriya et al., 2008), который передает ее на трансмембранный переносчик СТР1 (Kuo et al., 2006).

В печени часть поступившей меди запасается в комплексе с МТ, либо встраивается в купроэнзимы и принимает участие в ферментативных процессах. Вторая часть поступает в аппарат Гольджи, где включается состав новосинтезированного ЦП, после чего секретировается в кровоток и распределяется по организму. Избыток меди выводится из организма через желчь (Cousins, 1985; Kim et al., 2009). В кровотоке ЦП постепенно теряет остатки сиаловых кислот. Асиаловый ЦП эндоцитируется клетками печени при помощи рецепторов асиалогликопротеинов (Пучкова и др., 1997). В лизосомах деградация асиалового ЦП сопровождается высвобождением ионов меди, которые вновь поступают в цитозоль клетки и могут подвергаться рециклизации, либо быть выведены через желчь (Omoto and Tavassoli, 1989).

Сравнительная характеристика ЭТММ и ВТММ в печени и сыворотке крови крыс представлена в таблице 1.4. Имеющие в литературе данные, касающиеся особенностей метаболизма меди в различные периоды онтогенеза, в

основном рассматривают метаболизм меди в печени. Но важно также понять, какими особенностями характеризуется обмен меди в надпочечниках и происходит ли в данном органе смена ЭТММ на ВТММ.

Таблица 1.4. Сравнительная характеристика ЭТММ и ВТММ в печени и сыворотке крови крыс

	ЭТММ	ВТММ
Источник пищевой меди	ЦП молока	Низкомолекулярные лиганды Cu(II)
Концентрация меди в печени	В 50 раз и больше, чем у взрослых	Резко снижается после 13-го дня жизни
Концентрация меди в сыворотке крови	В 3-4 раза ниже, чем у взрослых	Увеличивается
Церулоплазмин	Ген <i>Cp</i> практически не активен в печени, низкое содержание секреторного ЦП в сыворотке	Активируется ген <i>Cp</i> в печени, увеличивается содержание секреторного ЦП в сыворотке
Рецептор ЦП	Синтезируется в печени и клетках слизистой оболочки кишечника	Активность гена полностью подавляется
Выведение меди	Через мочу	Через желчь
АТР7А	Ген активно экспрессируется	Активность гена полностью подавляется
АТР7В	Ген не активен	Ген активируется

Однако в литературе отсутствуют какие-либо данные, касающиеся этого вопроса. Исключение составляет работа Fazekas с соавторами, в которой доложен факт, что в надпочечниках эмбрионов концентрация меди выше, чем у взрослых (*Fazekas et al., 1963*).

1.3. Надпочечники

1.3.1. Строение надпочечников

Надпочечники млекопитающих представляют собой парные эндокринные железы, расположенные вблизи верхних полюсов почек. Морфологически каждый надпочечник состоит из двух структур – коркового вещества и мозгового вещества (Рис. 1.3). Несмотря на то, что корковое и мозговое вещества надпочечников являются частью одного органа, функционально они

представляют собой две самостоятельные эндокринные железы. Кроме того, данные структуры имеют различное происхождение в эмбриогенезе. Так, мозговое вещество надпочечников является производным эктодермы и развивается из зачатка нервного гребня, в то время как корковое вещество имеет мезодермальное происхождение.

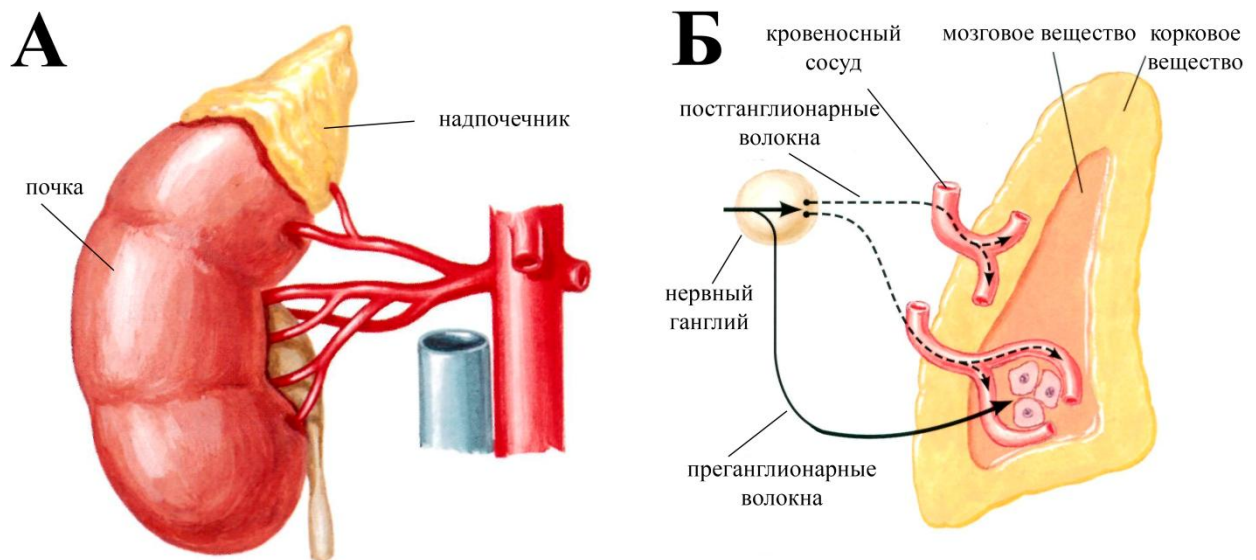


Рис. 1.3. Расположение и строение надпочечников (Неттер, 2003).

А – расположение правого надпочечника относительно соответствующей почки. **Б** – строение надпочечника в разрезе. Постганглионарные волокна иннервируют кровеносные сосуды, преганглионарные волокна доходят до клеток мозгового вещества.

Корковое вещество надпочечников состоит из трех concentric морфофункциональных зон клеток – клубочковой, пучковой и сетчатой (Рис. 1.4 А). Впервые такое разделение было описано в 1866 году (Arnold, 1866). Поверхностная клубочковая зона представляет собой тонкий участок столбчатых секреторных клеток (Rosol et al., 2001). На долю пучковой зоны приходится около 70 % объема всего коркового вещества. Она представлена столбцами многогранных секреторных клеток, разделенных капиллярами. Сетчатая зона также состоит из многогранных клеток, однако их организация больше напоминает кластеры. Клетки каждой зоны имеют ультраструктурные особенности, позволяющие их легко идентифицировать. Так, клетки клубочковой зоны характеризуются ярко выраженным аппаратом Гольджи и митохондриями,

кristы которых по форме напоминают лист. Пучковая зона содержит клетки со множеством липидных капель в цитоплазме и обширным гладким эндоплазматическим ретикулумом. Митохондрии этих клеток имеют кристы везикулярной формы. Клетки сетчатой зоны легко различимы по наличию отчетливых лизосом и митохондриям с тубулярно-везикулярной формой крист (Rosol et al., 2001).

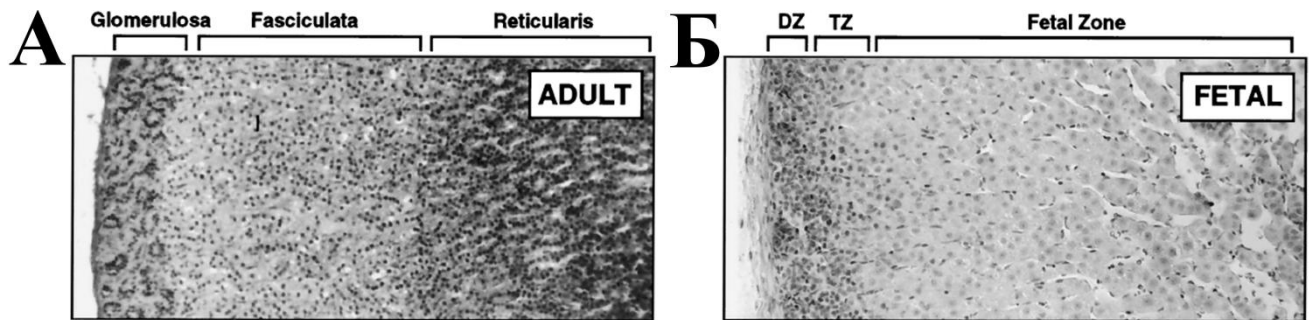


Рис. 1.4. Строение коркового вещества надпочечников

(Mesiano and Jaffe, 1997).

А – Морфология коркового вещества надпочечников взрослого человека. Glomeruloza – клубочковая зона, fasciculate – пучковая зона, reticularis – сетчатая зона. **Б** – морфологическое строение коркового вещества надпочечника плода в середине периода эмбрионального развития. DZ – definitive zone (окончательная зона), TZ – transitional zone (зона перехода), fetal zone (зона плода).

У приматов во второй половине беременности выделяют особую форму эмбриональной коры надпочечников (Mesiano and Jaffe, 1997), клетки которой имеют многогранную форму и секретируют большое количество предшественников кортизола и эстрогена, необходимых для нормального развития плода (Рис. 1.4 Б). Эти клетки появляются во внешнем слое коркового вещества и мигрируют по направлению к центру, где они претерпевают гипертрофию и, впоследствии, апоптоз.

После рождения происходит быстрая регрессия, апоптоз и лизис клеток эмбриональной коры, расширение капиллярной сети и замещение эмбриональных клеток тремя слоями клеток, характерных для взрослого коркового вещества. У мышей аналогом эмбриональной коры является Х-зона. Хотя, в отличие от приматов, клетки Х-зоны появляются после рождения и являются полностью

сформированными к окончанию лактации. Функция этих клеток точно не установлена, но, предположительно, она сходна с функцией эмбрионального коркового вещества приматов. После окончания лактации начинается дегенерация Х-зоны.

Мозговое вещество надпочечников представляет собой внутреннюю область органа, состоящую из хромоаффинных клеток. У взрослых животных 66-75% хромоаффинных клеток занимаются секрецией адреналина, 25-33% продуцируют норадреналин, а также имеется небольшое количество грануло-содержащих клеток (около 4% у мышей и 1% у крыс). Кроме того, в мозговом веществе содержатся клетки пресинаптического симпатического ганглия. У крыс и мышей адреналин и норадреналин содержатся в различных клетках, хорошо различимых на ультраструктурном уровне (*Rosol et al., 2001*). Гранулы, содержащие норадреналин, выглядят более плотными при электронной микроскопии, они окружены широким пространством до мембраны. В то же время, адреналиновые гранулы менее плотные и окружены зернистым матриксом. У человека одни и те же хромоаффинные клетки содержат гранулы как с адреналином, так и с норадреналином.

1.3.2. Гормоны надпочечников

Клубочковая зона коркового вещества надпочечников отвечает преимущественно за синтез минералкортикоидов – гормонов кортикостероидной группы, действие которых направлено на поддержание водно-солевого баланса в организме. Они способствуют увеличению канальцевой реабсорбции Na^+ и Cl^- и экскреции K^+ в почках и, таким образом, регулируют объем внеклеточной жидкости. Повреждение клубочковой зоны и невозможность секреции альдостерона могут привести к гибели вследствие накопления высоких концентраций ионов калия, сопровождающегося потерей натрия, хлора и воды (*Ленинджер, 1985; Rosol et al., 2001*).

Пучковая зона производит в основном глюкокортикоиды – кортикостероиды, оказывающие влияние на обмен углеводов, белков, жиров и

нуклеиновых кислот. Наиболее важным метаболическим эффектом действия этих гормонов является стимуляция глюконеогенеза в печени. Избыточная секреция глюкокортикоидов является причиной болезни Кушинга, характеризующейся повышенной утомляемостью и слабостью мышц, что является результатом ускоренного превращения аминокислот в глюкозу, а также перераспределением жира в организме (*Ленинджер, 1985*). Биохимическим предшественником всех кортикостероидов является холестерин. Синтез гормонов данной группы находится под контролем гипоталамо-гипофизарной системы. В ответ на стрессорное воздействие на организм, гипоталамус начинает секрецию кортиколиберина, который, в свою очередь, стимулирует продукцию гипофизом адренокортикотропного гормона (АКТГ). АКТГ секретируется в кровоток и достигает клеток коркового вещества надпочечников, где стимулирует выработку кортикостероидных гормонов (*Keller-Wood and Dallman, 1984*).

Альдостерон является основным минералкортикоидным гормоном у человека. Его секрецию осуществляют исключительно клетки клубочковой зоны коры надпочечников (*Raven et al., 1983; Vinson, 2004; Vinson, 2009*). Основным органом – мишенью альдостерона являются почки, этот гормон является частью ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, отвечающей за регуляцию водно-солевого обмена (*Peters, 2012*). Предшественником альдостерона является минералкортикоид **дезоксикортикостерон**. Местом продукции дезоксикортикостерона является клубочковая зона, а также он синтезируется во внутренних зонах коркового вещества (*Raven et al., 1983*). Фермент альдостеронсинтаза, необходимый для синтеза альдостерона из дезоксикортикостерона, обнаружен исключительно во внешних слоях клеток клубочкового вещества (*Okamoto and Nonaka, 1992*). В пучковой и сетчатой зонах присутствует фермент 11-β-гидроксилаза, катализирующий превращение дезоксикортикостерона в кортикостерон.

Кортикостерон обладает как минералкортикоидной, так и глюкокортикоидной активностями. У многих позвоночных животных, включая крыс, он является наиболее важным и активным глюкокортикоидом. В то же

время, в организме человека и других приматов, а также у быков и овец роль кортикостерона незначительна и основную функцию по регуляции углеводного обмена выполняет *кортизол* (Vinson, 2004).

Секретами сетчатой зоны являются стероидные гормоны андрогенного ряда – *андростендион*, *дегидроэпиандростерон*. Наибольшей биологической активностью обладает *тестостерон*, но надпочечники продуцируют очень маленькое его количество. Андрогены коры надпочечников обладают тем же биологическим действием, что и андрогены, вырабатываемые половыми железами. Они отвечают за дифференцировку и функционирование репродуктивной системы. Во взрослом организме эти гормоны регулируют развитие вторичных половых признаков у самцов, сперматогенез в семенниках, а также обладают анаболическим действием, т.е. стимулируют синтез белка в тканях (Березов и Коровкин, 1998). Сами по себе, андрогены надпочечников не обладают биологической активностью, но способны на периферии превращаться в активные формы мужских половых гормонов (Розен, 1994). Секреция андрогенов корой надпочечников также находится под контролем АКТГ. Избыток андрогенов во время беременности приводит к вирилизации плода, имеющего женский генотип, т.е. к развитию у него мужского фенотипа.

Мозговое вещество надпочечников развивается в эмбриогенезе как производное нервного гребня, т.е. по существу оно является частью нервной системы. Хромаффинные клетки получают прямую иннервацию от волокон симпатической нервной системы и в ответ на стимуляцию секретируют во внеклеточную среду катехоламины – *адреналин* и *норадреналин*. Катехоламины являются производными дофамина, который, в свою очередь, синтезируется из аминокислоты тирозина. Секреция катехоламинов происходит постоянно на небольшом уровне, однако в состоянии стресса выработка этих гормонов резко усиливается. Адреналин является важнейшим гормоном, благодаря которому реализуется ответная реакция организма на стресс – “борьба или бегство”. Адреналин вызывает резкое повышение уровня глюкозы в крови за счет мобилизации ее запасов в гликогене печени. Кроме того, под действием

адреналина происходит сужение просвета периферических кровеносных сосудов (что в случае ранения позволяет избежать сильного кровотечения), а также расширение сосудов, снабжающих кровью сердце и скелетную мускулатуру (подготовка организма к бегству). За счет изменения кровоснабжения гладкой мускулатуры происходит также расширение бронхов и угнетение перистальтики желудочно-кишечного тракта (*Ленинджер, 1985; Розен, 1994*).

Норадреналин вызывает те же реакции в ответ на стресс, с той разницей, что он обладает более сильным сосудосуживающим действием, а его влияние на сердце, гладкую мускулатуру и обмен веществ менее выражено. Оба катехоламина стимулируют липолиз в жировой ткани и протеолиз в печени, что позволяет предотвратить гипогликемию.

Помимо катехоламинов, хромоаффинные клетки также синтезируют ряд пептидных гормонов, выполняющих регуляторную функцию в центральной нервной системе и желудочно-кишечном тракте – β -энкефалин, вещество P, нейротензин A, нейропептид Y и хромогранин (*Розен, 1994; Rosol et al., 2001*).

1.3.3. Место надпочечников в общем метаболизме меди у млекопитающих

Первое упоминание в базе публикаций Pubmed о влиянии надпочечников на метаболизм меди в печени встречается в исследовании 1970 года (*Gregoriadis and Sourkes, 1970*). Авторы показали повышение содержания меди в печени, снижение концентрации меди в почках, а также увеличение оксидазной активности в сыворотке крови крыс, спустя 6 недель после удаления надпочечников. Введение животным сульфата меди в виде инъекции или добавление его в питьевую воду приводило к еще большему накоплению меди в печени. Авторы впервые высказывают предположение, что надпочечники принимают участие в экскреции меди из печени и поддержании гомеостаза меди в печени. Кроме того, в данной работе сделан вывод, что влияние надпочечников на выведение меди из печени не обусловлено действием кортикостероидов, так как введение дезоксикортикостерона либо гидрокортикостерона не изменяло содержание меди в печени или уровень оксидазной активности в сыворотке крови. Повышение

концентрации меди в печени АЭ крыс было подтверждено в работе Fields с соавторами (*Fields et al., 1991*). Также было исследовано влияние АЭ на сперматогенез в семенниках. Было показано, что после удаления надпочечников у крыс наблюдались атрофия клеток Лейдига, нарушение сперматогенеза, концентрации меди и цинка в клетках семенников были повышены (*Nair et al., 1995*).

В группе Linder (*Hanson et al., 2001*) проследили распределение меченого серебра (^{110}Ag) в организме лактирующих и контрольных крыс. Было показано, что радиоактивное серебро через 1 час после введения обнаруживается в печени, надпочечниках, молочных железах, скелетных мышцах, яичниках и мочевом пузыре. Лактация приводит к более быстрому накоплению серебра в молочных железах самки, а также ^{110}Ag попадает в молоко и встраивается в молочный ЦП. Таким образом, распределение серебра в организме сходно с распределением меди. В нашей лаборатории на модели “серебряных” мышей была испытана способность органов накапливать серебро и медь (*Zatulovskiy et al., 2012*). Измерение содержания рассматриваемых металлов в тканях органов мышей, получающих с кормом хлорид серебра, показало накопление значительной части серебра в печени. Заметные количества металла обнаруживаются в легких и селезенке. Однако самая высокая удельная концентрация серебра была обнаружена в надпочечниках мышей.

Известно, что надпочечники нуждаются в интенсивном метаболизме меди. Помимо внутриклеточных убиквитинических медь-зависимых белков (СОД1 и ЦО), надпочечники обогащены специфическими купроэнзимами, участвующими в синтезе катехоламинов и процессе созревания нейропептидных предшественников, их уровень снижается после завершения созревания гипоталамо-гипофизарно эндокринной системы, что происходит примерно через две недели после рождения. Так, β -дофамин гидроксилаза осуществляет превращение дофамина в норадреналин, а пептидилглицин α -амидирующая монооксигеназа необходима для посттрансляционной модификации ряда нейропептидных гормонов, в том числе вещества Р и вазоактивного

интестинального полипептида (*Eipper et al., 1992; Klinman, 2006*). Кроме того, в процессе синтеза стероидных гормонов надпочечников происходит продукция свободных радикалов, что делает необходимым повышенное содержание СОД1, обеспечивающей защиту клетки. Между тем, сведения о метаболизме меди в надпочечниках, а также о месте, которое занимают надпочечники на схеме метаболизма меди в целом организме, почти отсутствуют. Такие данные могут быть ценными для понимания гомеодинамики меди в целом организме млекопитающих. Этим обусловлен выбор цели исследования.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Оборудование

В работе было использовано следующее оборудование:

- центрифуга Microfuge 22R (“Beckman Coulter”, США)
- центрифуга Avanti J-301 с ротором JA-17 (“Beckman Coulter”, США)
- центрифуга/вортекс MSC-6000 Multispin с роторами SR-16, R-1.5, R-0.5/0.2 (“Biosan”, Латвия)
- ультрацентрифуга Optima LE-80K с ротором SW 27 (“Beckman Coulter”, США)
- гомогенизатор T10 basic ULTRA-TURRAX (“IKA”, Германия)
- аппарат для горизонтального электрофореза (“Helicon”, Россия)
- системы для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN (“BioRad”, США) и miniVE (“GE Healthcare”, США)
- модуль для электропереноса белков Mini Trans-Blot (“BioRad”, США)
- система для изоэлектрического фокусирования Multiphore II (“GE Healthcare”, США)
- аппарат для иммуноэлектрофореза (“Реанал”, Венгрия)
- амплификатор MJ Mini (“BioRad”, США)
- весы аналитические Adventurer (“Ohaus”, США)
- рН-метр PHS-3D (“SanXin”, Китай)
- микротермостат М-208 (“БИС”, Россия)
- орбитальный шейкер OS-20 (“BioSan”, Латвия)
- рефрактометр ИРФ-454 Б2М (“КОМЗ”, Россия)
- спектрофотометр NanoDrop 2000с (“Thermo Scientific”, США)
- атомно-абсорбционный спектрометр ZEE nit 650 P (“Analytik Jena”, Германия)
- пламенный фотометр ПФА-378 (“Unico Inc”, США)
- источник УФ-излучения 2011 Macrovue (“ЛКВ”, Швеция)
- цифровая фотокамера PowerShot SX210 1S (“Canon”, Япония)

- сканер Scanjet G4050 (“Hewlett-Packard”, США).

2.2. Материалы

Антитела

- *К церулоплазмину крысы.* Поликлональные кроличьи антитела к церулоплазмину крысы ($A_{610/280}=0.047$) были получены в Отделе Молекулярной генетики Научно-исследовательского института Экспериментальной медицины РАМН по методу, разработанному Шавловским М.М. (*Gaitskhoki et al., 1981*). Данные антитела реагируют с церулоплазмином крысы и мыши, но не человека.
- *К МТ* (“Santa Cruz Biotechnology”, США). Поликлональные кроличьи антитела к металлотioneину (продукт ~15-42 кДа) рекомендованы производителем для детектирования всех изоформ металлотioneина широкого спектра видов млекопитающих, в том числе и крысы.
- *К COMMD1* (“Santa Cruz Biotechnology”, США). Поликлональные антитела козла, рекомендованные для детектирования белка COMMD1 (продукт ~21 кДа) крысы, мыши, и человека.
- *К СОД1* (“Abcam”, Великобритания). Поликлональные кроличьи антитела, взаимодействующие с белком СОД1 (продукт ~17 кДа) крысы, мыши и человека.
- *К субъединице 4 цитохром-с-оксидазы* (“Abcam”, Великобритания). Поликлональные кроличьи антитела, взаимодействующие с митохондриальным белком СОХ4 (продукт ~17 кДа) крысы, мыши, человека, шпорцевой лягушки, картофеля, африканской зеленой мартышки и китайского хомячка.
- *Вторые антитела против IgG кролика* (“Abcam”, Великобритания). Поликлональные козлиные антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена.

- *Вторые антитела против IgG козла* (“Santa Cruz Biotechnology”, США). Поликлональные ослиные антитела к IgG козла, конъюгированные с пероксидазой хрена.
- *Лиофилизированная сыворотка крови козла, иммунизированного гамма-иммуноглобулинами кролика* (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва).

Реагенты

- неорганические соли (“Merck”, Германия)
- кислоты и щелочи (“Вектон”, Россия)
- агароза типа V, легкоплавкая агароза, сахароза, Трис, Mmlv обратная транскриптаза, Taq-полимераза (“Хеликон”, Россия)
- ПЦР-буфер (“АмплиСенс”, Россия)
- смесь dNTP (“Promega”, США)
- ДНК-маркеры (“Сибэнзим”, Россия)
- орто-дианизидин (“Serva”, Германия)
- ферроцин (“Fluka”, Германия)
- нитротетразолий синий, белковые маркеры молекулярного веса (“BioRad”, США)
- Tween-20, Тритон X-100 (“Applichem”, Германия)
- нитроцеллюлозная мембрана Amersham Hyperfilm ECL, детекционная система Amersham ECL Western Blotting System, рентгеновская пленка Hyperfilm ECL, полоски для изоэлектрофокусирования DryStrip (“GE Healthcare”, США)
- реактив для выделения тотальной РНК “TRIzol” (“Invitrogen”, Великобритания)
- коктейль ингибиторов протеаз (“Sigma”, США)

2.3. Лабораторные животные

Работа выполнена на крысах линии Вистар, полученных из питомника “Рапполово” (Ленинградская область, Россия), а также их потомстве, полученном в виварии НИИ Экспериментальной медицины. Крыс содержали на деревянной стружке в пластмассовых клетках площадью 1815 см² или 720 см². В больших клетках содержали по 5 – 6 взрослых особей, в маленьких – по 1 самке с потомством. Животные получали стандартный корм и воду без ограничения. Температуру воздуха в помещении, где содержались крысы, поддерживали на уровне 22 – 25 °С, влажность составляла 60%, световой режим сменялся через каждые 12 часов. В экспериментах было задействовано 50 взрослых крыс и 110 новорожденных крыс разного возраста.

С лабораторными животными обращались в соответствии с “Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (ETS №123 от 18.03.1986, Страсбург, Франция), а также Поправкой к этой конвенции (ETS №170 от 02.12.2005). Исследования были одобрены Этическим комитетом НИИ Экспериментальной медицины (протокол №2/13 от 27.06.2013).

Удаление надпочечников у взрослых животных проводили под легким эфирным наркозом через два пояснично-спинных надреза. Для поддержания солевого баланса адреналэктомированные крысы (АЭ крысы) получали без ограничения раствор, содержащий 1% глюкозы, 1% NaCl и 0.5% KCl. Контрольная группа состояла из ложно-оперированных крыс (ЛО крысы) – животных подвергали хирургическому вмешательству, которое переносили АЭ крысы, но надпочечники идентифицировали и оставляли *in situ*. На 10-ый день после операции проводили декапитацию животных и осуществляли забор крови и органов. Кровь собирали из шейных сосудов крыс и оставляли до образования сгустка. Далее сыворотку отбирали, очищали центрифугированием при 5000×g в течение 10 минут, замораживали и хранили при -20 °С. Забор органов производили на льду, после чего образцы замораживали и хранили при -80 °С.

2.4. Методы исследования

2.4.1. Экспериментальные методы

Выделение тотальной РНК

Тотальную РНК выделяли с помощью коммерческого реактива “TRIzol” (TriPure Isolation Reagent), в соответствии с инструкцией производителя. Навеску ткани (около 50 мг) гомогенизировали в 1 мл реактива “TriZol”, затем центрифугировали в течение 10 минут при $12000\times g$. К полученному супернатанту добавляли 200 мкл хлороформа, пробирку аккуратно переворачивали 15 раз и оставляли на 15 минут при комнатной температуре. Далее смесь центрифугировали при $12000\times g$ в течение 15 минут, после чего аккуратно отбирали прозрачную верхнюю фазу, содержащую РНК. К полученному раствору добавляли 500 мкл изопропанола, после чего содержимое пробирки перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Далее, осадок, полученный после центрифугирования смеси при $12000\times g$ в течение 10 минут, промывали 1 мл ледяного 70%-ного этилового спирта. После инкубации в течение 5 – 10 минут при комнатной температуре пробу центрифугировали 7 минут при $7500\times g$. Полученный осадок высушивали при комнатной температуре. Далее осадок растворяли в воде, обработанной диэтилпиروкарбонатом, и измеряли концентрацию РНК. Препараты тотальной РНК хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически при длинах волн 260 нм и 280 нм, по стандартной методике (*Маниатис и др., 1984*). По соотношению оптических плотностей $D_{260/280}$ и получаемым спектрам судили о чистоте препаратов РНК. О качестве образцов РНК судили также по визуальному представлению электрофоретических зон, соответствующих 18S и 28S рРНК, после электрофореза в 1.4% агарозном геле.

Обратная транскрипция, сопряженная с полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР)

Синтез кДНК с помощью обратной транскрипции (ОТ) проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг тотальной РНК, 200 единиц обратной транскриптазы (MMIv), 1 мкМ смеси случайных праймеров, эквимольную смесь четырех dNTP по 500 мкМ каждого, однократный буфер для обратной транскриптазы и 25 единиц ингибитора РНКаз. Перед добавлением в инкубационную смесь, РНК отжигали с праймерами в течение 5 минут при 70 °С. Реакцию проводили в течение 1 часа при 37 °С.

ПЦР проводили в 30 мкл смеси, содержащей 1 мкл синтезированной кДНК, 1.5 единицы рекомбинантной Taq-полимеразы, эквимольную смесь четырёх dNTP по 150 мкМ каждого, однократный ПЦР-буфер, содержащий 3 мМ Mg²⁺, и по 25 пМ каждого из пары специфических праймеров. Подбор праймеров осуществлялся с помощью он-лайн приложений “BLAST” и “Primer-BLAST” на сайте NCBI (National Center for Biotechnology Information, Национальный центр биотехнологической информации, США, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Специфические температуры, при которых проводили отжиг праймеров (T_{an}), и нуклеотидные последовательности для каждой пары праймеров приведены в таблице 2.1. Специфические праймеры были синтезированы фирмой “Синтол” (Россия).

Реакцию проводили по следующей схеме:

- начальная денатурация: 94 °С, 5 минут;
- циклы синтеза: денатурация: 94 °С, 1 минута;
отжиг праймеров: T_{an} , 1 минута;
элонгация: 72 °С, 1 минута;
- финальная элонгация 72 °С, 7 минут.

Для каждой используемой пары праймеров определяли количество циклов насыщения ПЦР и при постановке эксперимента выбирали такое количество циклов, при котором насыщения не наступало. Для праймеров к β-актину число циклов составляло 28, для остальных праймеров – 30.

Таблица 2.1.

Праймеры, использованные для проведения ПЦР-анализа.

Название гена	Положение	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Размер продукта (н.п.)	T_{an} (°C)
1	2	3	4	5
<i>β-actin</i>	прямой	gaa gat cct gac cga gcg tg	327	59
	обратный	agc act gtg ttg gca tag ag		
<i>Cp</i>	прямой	agt aaa caa agt cac aac gag gaa t	398	57
	обратный	tcg tat tcc act tat cac caa ttt a		
<i>ГФИ-Ср</i>	прямой	agt aaa caa agt cac aac gag gaa t	436	57
	обратный	ctc ctt ggt aga tat ttg gaa taa a		
<i>Cp(2-4)</i>	прямой	caa agc tga agt tgg aga caa agt t	390	60
	обратный	aga ttt tca tcc ac caca gag aac a		
<i>Ctrl</i>	прямой	tgc cta tga cct tct act ttg g	358	57
	обратный	atg aag atg agc atg agg aag		
<i>Ctrl2</i>	прямой	gag gct gtg ctt ctc ttt gat t	203	60
	обратный	gag cct gta gaa tcc tgg tct g		
<i>Atp7a</i>	прямой	gaa gcc tac ttt ccc ggc tac aac aga agc	421	64
	обратный	agg tac cca agg ttt cag tgt cca gct cc		
<i>Atp7b</i>	прямой	cag aag tac ttt cct agc cct agc cct agc aag c	332	65
	обратный	ccc acc aca gcc aga acc ttc ctg ag		
<i>Sod1</i>	прямой	aca ata cac aag gct gta cca ctg cag g	220	62
	обратный	tca tct tgt ttc tcg tgg acc acc ata g		
<i>Ccs</i>	прямой	cag tct ggt tgt tga tga ggg aga ag	265	60
	обратный	act gaa taa cct gac agg agg ctc tg		
<i>Commd1</i>	прямой	gag ggg aat tct caa gtc tat tgc	307	60
	обратный	ctc aga ttc ccg tcc act tct c		
<i>Cox4i1</i>	прямой	aag aga gcc att tct act tcg gtg tg	484	60
	обратный	cag gct ctc act tct tcc att cat tc		
<i>Mt1a</i>	прямой	cga ctg cct tct tgt cgc tta cac c	350	58
	обратный	tca cat gct cgg tag aaa acg ggg t		

1	2	3	4	5
<i>Mt2a</i>	прямой	cga tct ctc gtt gat ctc caa	276	56
	обратный	ggc tag gtt cct acg ttg ttt		
<i>Tf</i>	прямой	ctg caa gtt cga tga att ttt cag t	251	59
	обратный	agt ctt cct gct tca gat cct tag c		
<i>Tfrc</i>	прямой	agg aac cag acc gct aca ttg ta	257	59
	обратный	aat gta agt gaa agc ctt tag atg caa		
<i>Fth1</i>	прямой	gac agt gct tga acg gaa ccc ggt g	279	62
	обратный	tct tca ggg cca cat cat ccc ggt c		
<i>Ftl</i>	прямой	tcg tca gaa tta ttc cac cga agt	265	59
	обратный	ggg ttt acc cca ctc atc ttg aga		
<i>Pam</i>	прямой	ctt tgt cat ggt ttc cag gat t	289	60
	обратный	tat atg aaa tgg caa aga cat tcc t		

Для селективного выявления мРНК секреторного ЦП и мРНК, кодирующей ГФИ-ЦП, использовали общий прямой праймер и различные обратные праймеры. При дизайне праймеров основывались на данных о механизме формирования альтернативных форм ЦП-мРНК (*Patel et al., 2000*). Праймер *Cp(2-4)*, подобранный на 2 – 4 экзоны гена *Cp*, обнаруживает как секреторный ЦП, так и ГФИ-ЦП.

Электрофоретический анализ ПЦР продуктов проводили в 1.4% агарозном геле на ТВЕ буфере (0.089 М Tris-HCl, 0.089 М борная кислота, 0.002 М ЭДТА, рН 8.0) в камере для горизонтального электрофореза (*Sambrook et al., 1989*). Для визуализации нуклеиновых кислот в гель добавляли бромистый этидий. В качестве маркера использовали набор из 10 фрагментов ДНК длиной от 100 до 1000 н.п. Гели просматривали на УФ-трансиллюминаторе и фотографировали на цифровую камеру для последующего анализа.

При использовании всех перечисленных праймеров в приведенных условиях синтезировались только ПЦР продукты вычисленного размера (Рис. 2.1). Для полуколичественной характеристики экспрессии генов медьтранспортных белков и купроэнзимов использовали соотношение между квазистационарным уровнем мРНК исследуемого гена и мРНК β -актина, который

экспрессируется в печени и надпочечниках крыс разного возраста примерно на одинаковом уровне так, что доля его мРНК от тотальной мРНК примерно одинакова (Marone et al., 2001).

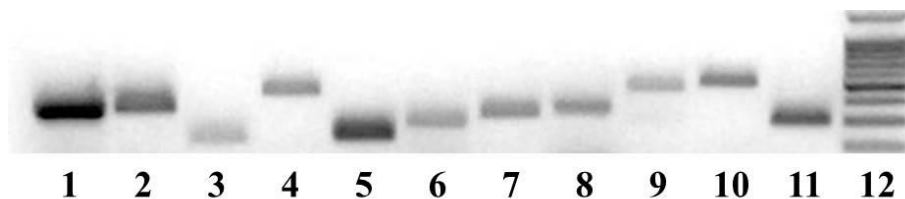


Рис. 2.1. Пример протокола ОТ-ПЦР анализа.

Электрофорез амплификатов, полученных на тотальной РНК, выделенной из надпочечников взрослых крыс: 1 – *β-actin*, 2 – *Ctrl1*, 3 – *Ctrl2*, 4 – *Atp7a*, 5 – *Sod1*, 6 – *Ccs*, 7 – *Commd1*, 8 – *Mtl1a*, 9 – *ГФИ-Ср*, 10 – *Cox4i1*, 11 – *Ram*, 12 – маркеры.

Денситометрический анализ электрофоретических гелей осуществляли с помощью компьютерных программ “Scion Image” (<http://scion-image.software.informer.com/>) и “ImageJ” (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Результаты анализа выражали в условных единицах как отношение количества образовавшегося ПЦР-продукта на данной мРНК к количеству ПЦР-продукта β -актина, полученного на этих же препаратах РНК в этих же опытах. В работе приведены средние значения из трех и более независимых экспериментов.

Выделение субклеточных фракций методом дифференциального центрифугирования

Для получения субклеточных фракций образцы ткани были гомогенизированы в буфере Н, содержащем 250 мМ сахарозы, 100 мМ КСl, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 5 мМ ДТТ и 0.5 мкл/мл коктейля ингибиторов протеаз. Гомогенаты последовательно центрифугировали 2 раза в течение 10 минут при 800×g для очистки от ядер и фрагментов клеточных мембран. Супернатант центрифугировали в течение 20 минут при 12000×g. Осадок, содержащий митохондриальную фракцию, ресуспендировали в гомогенизирующем буфере (ГБ) с добавлением к нему 2% тритона X-100,

инкубировали в течение 20 минут на льду, после чего центрифугировали в течение 20 минут при $17000\times g$. Полученный осадок, содержащий митохондриальную фракцию, ресуспендировали в ГБ.

Для выделения цитозольной фракции, постмитохондриальный супернатант очищали центрифугированием при $17000\times g$ в течение 1 часа.

Получение субклеточных фракций методом равновесного ультрацентрифугирования

Гомогенизацию образцов печени проводили в ГБ, как описано ранее. Далее гомогенаты пропускали через 6 слоев марли для очистки от неразрушенных фрагментов ткани, после чего центрифугировали в течение 10 минут при $800\times g$. Полученный осадок состоял из ядер из фрагментов клеточных мембран. Для того чтобы оценить распределение меди между ядрами и фрагментами мембран, осадки ресуспендировали в ГБ, отбирали аликвоту для измерения концентрации меди, после чего оставшееся количество материала наслаивали на 1.5 М сахарозную подушку и центрифугировали в течение 2 часов при $15000\times g$. Осадки, содержащие ядра, собирали, ресуспендировали, в них измеряли концентрацию меди, которую выражали в процентах от общего содержания меди во фракции, седиментировавшей при $800\times g$. Грубая митохондриальная фракция была получена как осадок от центрифугирования постъядерного супернатанта при $12000\times g$ в течение 20 минут.

Для разделения митохондрий, лизосом и пероксисом полученный осадок ресуспендировали в ГБ и нанесли на ступенчатый градиент сахарозы (27–42–45–47–50%), после чего центрифугировали при $58000\times g$ в течение 5 часов на ультрацентрифуге Optima LE-80K, ротор SW27. После центрифугирования из градиента отобрали фракции объемом по 1 мл, в которых плотность сахарозы измерили рефрактометром.

Фракция, отобранная на границе 45% сахарозы (плотность $1.18 - 1.19 \text{ г/см}^3$), включает митохондрии; материал, собранный на границе 47% сахарозы (плотность 1.20 г/см^3), соответствует лизосомальной фракции; фракция,

собираемая на границе 50% сахарозы (плотность 1.22 г/см³), содержит пероксисомы. Полученные фракции митохондрий, лизосом и пероксисом развели в 4 раза ГБ, центрифугировали при 15000×g в течение 30 минут, после чего отобрали осадки. Фракция, содержащая внутриклеточные мембраны, была изолирована из постмитохондриального супернатанта центрифугированием при 23000×g в течение 1 часа. Супернатант последнего центрифугирования представлял собой цитозольную фракцию.

Все полученные фракции лизировали в смеси 5% ДСН и 1% NaOH (1:4 v/v), прогревали до полного растворения материала, после чего в полученных пробах измеряли концентрацию общего белка и содержание меди.

Определение содержания митохондриальной ДНК (мтДНК)

Для определения содержания мтДНК очищенные препараты митохондрий и цитозоля печени (20 мкг белка) лизировали в 30 мкл буфера, включающего 20 мкМ ДТТ, 1.7 мкМ ДСН и 0.05 мкг/мкл протеиназы К. Далее пробы в лизирующей смеси инкубировали в течение 2 часов при 55 °С. После инкубации к 23 мкл лизированной смеси добавляли 7 мкл ПЦР-смеси, включавшей 1.5 единицы рекомбинантной Taq-полимеразы, эквимольную смесь четырёх dNTP по 200 мкМ каждого, однократный ПЦР-буфер, содержащего 3 мМ Mg²⁺, и по 25 пМ каждого из пары специфических праймеров. Последовательности специфических праймеров, подобранных для амплификации митохондриальной ДНК приведены в таблице 2.2.

Таблица 2.2.

Праймеры, использованные для выявления мтДНК

Положение	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Размер продукта (н.п.)	T _{an} (°C)
прямой	ggt tct tac ttc agg ggc cat c	518	62
обратный	gtg gaa ttt tct gag ggt agg c		

Амплификацию, электрофорез амплификатов, а также денситометрический анализ полученных гелей проводили, как описано выше. Число циклов амплификации составляло 25.

Для амплификации был выбран регуляторный участок мтДНК – D-петля. Это переменный участок митохондриального генома, не имеющий аналогов в ядерном геноме (Рис. 2.2). Праймеры амплифицируют участок мтДНК от 15785 по 16299 н. тяжелой цепи мтДНК.

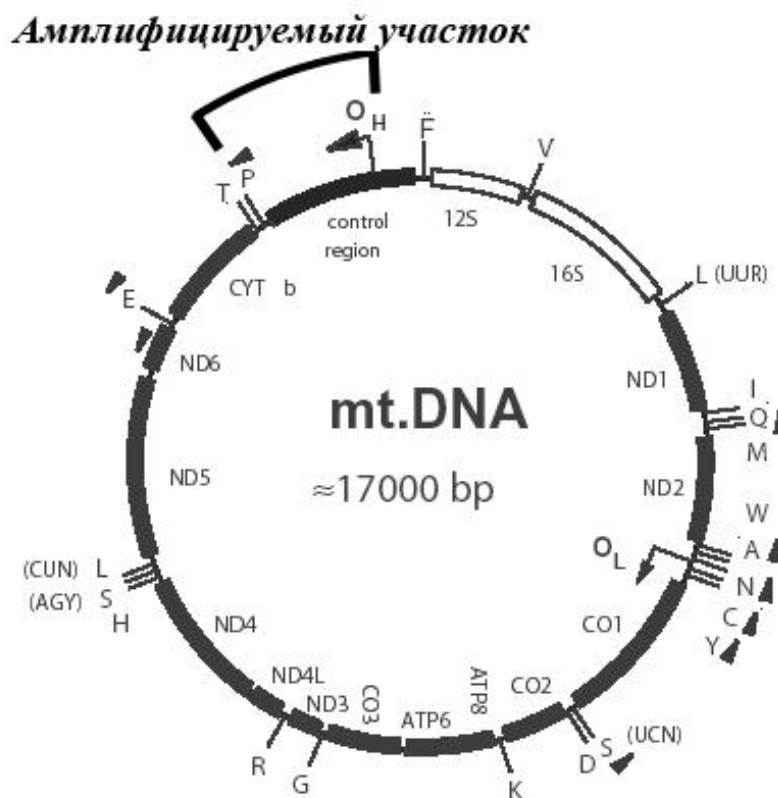


Рис. 2.2. Положение амплифицируемого участка на мтДНК.

Гель-фильтрация

Гель-фильтрацию образцов цитозоля печени (2 мл, содержание общего белка 20 мг/мл) проводили на колонке (10 – 40 мкм, 1.6×40 см) с Сефадексом G75 в 20 mM Трис-НСl буфере (pH 7.6), содержащем 5 mM 2-меркаптоэтанол. Скорость элюции составляла 0.5 мл/мин.

Образцы сыворотки крови были фракционированы на такой же колонке в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7.4. Свободный объем колонки оценивали с

помощью декстранового синего. Фракции, следовавшие за свободным объемом, собирали (1.5 мл) и измеряли в них оптическую плотность при длинах волн 280 и 254 нм и концентрацию меди.

Электрофоретическое разделение белков

Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) 8%, 10% или 15% в зависимости от молекулярной массы исследуемого белка, в неденатурирующих условиях, либо с добавлением 1% додецилсульфата натрия (ДСН) (*Laemmli, 1970*). После окончания неденатурирующего электрофореза гели окрашивали специфическими хромогенными субстратами для выявления ферментативной активности исследуемых белков. После ДСН-электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) для последующего анализа методом иммуноблоттинга.

Иммуноблоттинг

Перенос белков на НЦМ осуществляли в системе для “мокрого” электропереноса Mini Trans-Blot при постоянной силе тока 350 мА в течение 1 часа. Качество электропереноса и равномерность нанесения проб на дорожки контролировали окрашивание Понсо S. Для денситометрического анализа, окрашенную Понсо S НЦМ сканировали, тонкую горизонтальную полосу, соответствующую примерно 50 кДа, использовали для нормализации (*Aldridge et al., 2008*).

НЦМ отмывали от Понсо S раствором PBS, содержащим 0.2% Tween-20 (PBST). Далее проводили неспецифическую забивку НЦМ раствором BLOTTO (5% раствор обезжиренного молока, приготовленный на PBST) в течение ночи при 4 °С. После забивки НЦМ инкубировали с первыми антителами в течение 1 часа либо в течение ночи, при 4 °С. Отмывку НЦМ от первых антител проводили 3 раза по 5 минут раствором PBST, после чего НЦМ в течение 1 часа при 4 °С инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена,

и отмывали аналогично описанному ранее. Иммунные комплексы выявляли методом усиленной хемилюминесценции с использованием системы Amersham ECL Western Blotting System. Полученные рентгеновские пленки сканировали и подвергали денситометрическому анализу.

Ракетный иммуноэлектрофорез

Содержание иммунореактивных полипептидов белка ЦП определяли при помощи ракетного иммуноэлектрофореза (*Kroll, 1973*). Агарозный гель (1%), содержащий 400 мг/мл специфических антител к ЦП готовили на электродном буфере, содержащем 187 мМ Трис, 374 мМ глицина, 5.6 мМ барбитала, 32 мМ барбитала натрия, рН 8.8. В лунки наносили аликвоты сывороток крови взрослых крыс объемом 1.5 мкл, либо аликвоты сывороток новорожденных крыс объемом 3 мкл.

Электрофорез проводили в течение ночи при постоянном напряжении 10 В/см геля, при 10 – 15 °С. Далее гели отжимали и высушивали. Иммунные зоны визуализировали при помощи окрашивания орто-дианизидином. Площадь пика преципитации измеряли как площадь равнобедренного треугольника. Каждая пластинка геля содержала лунки, в которые в качестве количественных стандартов добавляли растворы ЦП крысы ($A_{610}/A_{280}=0.045$) с известными концентрациями.

Двумерный электрофорез

Двумерный электрофорез проводили в соответствии с протоколом, разработанным Нарыжным С.Н. (*Naryzhny and Lee, 2001; Naryzhny and Lee, 2003*). Препараты митохондриальных фракций, содержащие 80 мкг белка растворяли в двукратном объеме лизирующего буфера, содержащего 7 М мочевины, 2 М тиомочевину, 4% CHAPS, 1% ДТТ и коктейль ингибиторов протеаз. В первом направлении электрофореза белки разделяли изоэлектрофокусированием (ИЭФ), используя полоски DryStrip kit длиной 7 см. Образцы в лизирующем буфере смешивали с регидратирующим буфером, содержащим 7 М мочевины, 2 М

тиомочевину, 2% CHAPS, 0.3% ДТТ, 2% IPG буфер (pH 3 – 11) и 0.001% бромфенол голубой, в конечном объеме 130 мкл. Полоски регидратировали в указанной смеси при 4 °С в течение 4 часов.

ИЭФ вели при 20 °С в аппарате Multiphore II по программе: 10 минут при 300 V, затем 1.5 часа при линейном градиенте от 300 V до 3500 V и далее 2 часа при 3500 V. Перед проведением электрофореза во втором направлении полоски вымачивали 2 раза по 10 минут в уравнивающем растворе (50 mM Трис-НСl, pH 6.8, 6 M мочевины, 2% ДСН и 30% глицерин), содержащем сначала 1% ДТТ, а затем 5% иодацетамид. Далее каждую полоску помещали сверху на ПААГ второго направления и закрепляли 1 мл раствора 0.5% агарозы, приготовленной на трис-глициновом электродном буфере (25 mM Трис, pH 8.3, 200 mM глицин и 0.1% ДСН). Денатурирующий электрофорез второго направления вели, используя систему miniVE, в 12% ПААГ размером 8×9 см, при комнатной температуре, постоянном токе 25 мА/гель и напряжении 100 – 160 V в течение 1.5 часов.

После завершения электрофореза ПААГ отмывали от ДСН и фиксировали 2 раза по 15 минут в растворе 25% изопропанола с 10% уксусной кислотой. Далее белки в геле визуализировали окрашиванием нитратом серебра по методу Shevchenko с соавторами, модифицированному Winkler с соавторами (*Shevchenko et al., 2006; Winkler et al., 2007*). Гель после фиксации ополаскивали в воде в течение 10 минут, после чего обрабатывали раствором тиосульфата натрия (0.2 г/л) в течение 1 минуты. Гель промывали водой 2 раза по 20 секунд и инкубировали в течение 30 минут в растворе нитрата серебра (2 г/л). После быстрого (30 секунд) ополаскивания геля в воде гель опускали в раствор проявителя (3% карбоната натрия, 0.05% формальдегида на 0.001% тиосульфата натрия). Реакцию останавливали переносом геля в 10% уксусную кислоту.

Выявление оксидазной активности ЦП в геле методом окрашивания орто-дианизидином

Для определения оксидазной активности ЦП гель после неденатурирующего электрофореза инкубировали в растворе орто-дианизида,

приготовленного на 0.05 М натрий ацетатном буфере, рН 4.5, содержащем 2% этанола. Инкубацию проводили в течение 2 часов при 37 °С, после чего гель сканировали и подвергали денситометрическому анализу (*Owen et al., 1961*).

Выявление ферроксидазной активности ЦП в геле методом окрашивания ферроцином

После электрофореза в неденатурирующих условиях гель помещали на 2 часа при 37 °С в свежеприготовленный раствор 0.008 % соли Мора на 100 мМ натрий-ацетатном буфере, рН 5.0. Гель отмывали и в темноте насыщали 15 мМ раствором ферроцина, приготовленным на воде, рН 7.0.

Активность выявлялась по отсутствию пурпурной окраски в местах локализации ферроксидаз (*Chen et al., 2004*). Гель сканировали и проводили денситометрический анализ.

Выявление активности СОД1 в геле методом окрашивания нитротетразолием синим

Гель после нативного электрофореза инкубировали 15 минут в 10% растворе нитротетразолия синего на 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7.0. После промывания геля в воде инкубировали еще 15 минут в темноте с раствором 100 мМ калий-фосфатного буфера и 10% TEMED. Добавляли 1% раствор рибофлавина, инкубировали в течение еще 15 минут. Гель промывали в воде, реакцию активировали УФ-облучением в течение 5-10 минут до появления полос белого цвета, соответствующих активности супероксид-дисмутазы (*Vives-Bauza et al., 2007*). Гель сканировали, проводили денситометрический анализ полученных данных.

Иммунопреципитация

Белок ЦП преципитировали из 50 мкл сыворотки крови инкубацией с 500 мкл IgG (1 мг/л), полученными из сыворотки кролика, иммунизированного крысиным ЦП. Инкубацию проводили в течение ночи при 4 °С с постоянным

перемешиванием. Использованное соотношение сыворотки и антител соответствует полной и специфической иммунопреципитации (*Platonova et al., 2007*). Далее смеси центрифугировали при $10000\times g$ в течение 20 минут, осадки дважды промывали PBS, осаждали центрифугированием и растворяли в 400 мкл концентрированной азотной кислоты.

Иммунопреципитацию белка МТ проводили в два этапа. В начале, к 300 мкл сыворотки крыс добавили по 5 мкл коммерческих антител к МТ. Смесь инкубировали в течение ночи при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и постоянном перемешивании. На втором этапе к смеси добавляли по 170 мкг IgG (1 мг/мл), выделенных из сыворотки осла, иммунизированного кроличьими IgG (вторые антитела) и по 10 мкл кроличьей сыворотки, которую использовали для усиления второго этапа преципитации. После инкубации в течение ночи при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ и постоянном перемешивании, смеси центрифугировали при $10000\times g$ в течение 20 минут, осадки дважды промывали PBS, осаждали центрифугированием и растворяли в 400 мкл концентрированной азотной кислоты.

Концентрацию общего белка в пробах определяли по методу Брэдфорд (*Bradford, 1976*).

Измерение концентрации металлов

Концентрацию металлов определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) с электротермической атомизацией и зеемановской коррекцией неселективного поглощения на спектрофотометре ZEEnit 650 P. Образцы ткани были гомогенизированы в смеси концентрированных азотной и соляной кислот (1:3 v/v) до полного растворения материала. Концентрацию меди и цинка в образцах сыворотки крови измеряли без предварительной подготовки пробы.

Концентрацию натрия и калия измеряли методом пламенной фотометрии на пламенном фотометре ПФА-378.

2.4.2. Компьютерные методы

По данным литературы были определены последовательности ДНК, через взаимодействие с которыми гормоны надпочечников осуществляют регуляцию экспрессии генов. Далее из открытой он-лайн базы данных Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) были получены последовательности длиной 3000 оснований выше начала первого экзона генов крысы, кодирующих белки, ассоциированные с метаболизмом меди. После чего в этих промоторных областях поиск паттернов, совпадающих с исследуемыми регуляторными последовательностями, был произведен при помощи он-лайн сервиса “RSA-tool” (http://rsat.ulb.ac.be/dna-pattern_form.cgi).

2.4.3. Статистическая обработка результатов

Данные представлены в виде “среднее значение \pm стандартное отклонение”. Статистическую обработку результатов проводили с применением двустороннего критерия Стьюдента, а также дисперсионного анализа. Изменения принимали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0.05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние адреналэктомии на метаболизм меди у крыс

Влияние адреналэктомии (АЭ) на параметры метаболизма меди изучали на молодых половозрелых (3 – 6-месячных) крысах (АЭ крысы). В качестве группы сравнения использовали крыс, перенесших аналогичную хирургическую процедуру, сопровождавшуюся идентификацией, но не удалением надпочечников – ложно-оперированные животные (ЛО крысы). Физиологическое действие АЭ контролировали по изменению отношения концентрации натрия к концентрации калия в сыворотке крови. У крыс контрольной группы отношение $[Na]/[K]$ соответствовало таковому у интактных крыс (25.5 ± 0.5). У АЭ крыс на 10-ый день после операции величина $[Na]/[K]$ снижалась (Рис. 3.1). Наблюдение соответствует картине, развивающейся вследствие дефицита минералкортикоидов и нарушения реабсорбции натрия, и свидетельствует, что изучение метаболизма меди в печени проводили на фоне изменений, развивающихся при АЭ.

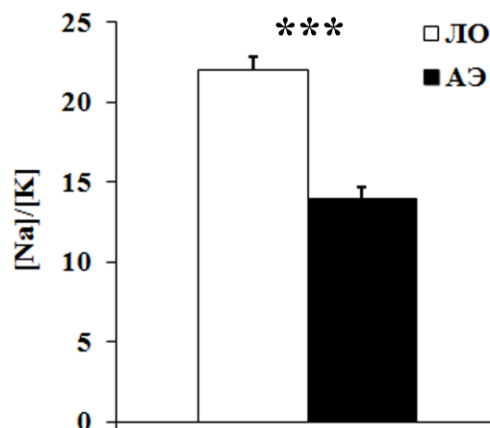


Рис. 3.1. Индекс отношения ионов натрия и калия в сыворотке крови крыс ($n = 5$).

*** $p < 0.005$.

3.1.1. Изменения статуса меди в сыворотке крови крыс после АЭ

В сыворотках крови животных было проведено определение общепринятых показателей статуса меди: концентрация общей меди, содержание белка ЦП и его

ферментативная активность. К показателям статуса меди добавлена также концентрация металлотионеина (МТ). В последние годы накапливается все больше фактов, свидетельствующих о том, что МТ, внутриклеточный белок, ген которого не содержит последовательностей, обеспечивающих секрецию белка через секреторный путь клетки, обнаруживается в сыворотке крови. Причем уровень МТ в сыворотке зависит от таких факторов, как концентрация тяжелых металлов в крови и наличие умеренного стресса (*Nordberg et al., 1982; Armario et al., 1987; Hidalgo et al., 2001; Bizon and Milnerowicz, 2014*). К тому же, МТ, вероятно, участвует в секреции меди и цитокинов путем, не зависимым от аппарата Гольджи (*Prudovsky, 2013; Vasak and Meloni., 2011*).

Так как набор гормонов, производимых надпочечниками, у самцов и самок отличаются, на первом этапе было проверено, отличаются ли показатели статуса меди у АЭ крыс в зависимости от пола. Различий показателей статуса меди между самцами и самками выявлено не было (данные не приводятся). В последующем в работе использовали самцов, как пол с более стабильными показателями статуса меди, которые у самок меняются при овуляции, беременности и лактации.

АЭ приводит к повышению концентрации меди в сыворотке крови, в то время как содержание цинка, другого важного микроэлемента, не ассоциированного с метаболизмом меди, остается неизменным (Рис. 3.2).

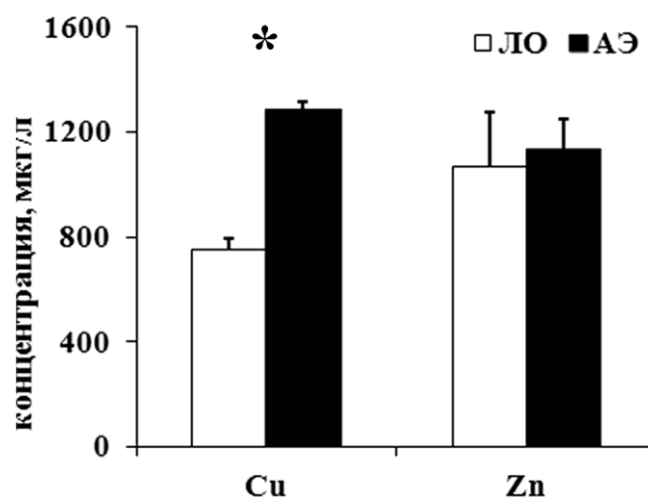


Рис. 3.2. Концентрация меди и цинка в сыворотке крови ЛО и АЭ крыс (n = 5).

* $p < 0.05$.

В сыворотке крови АЭ крыс, по данным ракетного иммуноэлектрофореза, повышается содержание иммунореактивных полипептидов ЦП (Рис. 3.3 А). Относительный уровень оксидазной и ферроксидазной активностей ЦП был определен в ПААГ с помощью специфического окрашивания соответствующими небιοгенными хромогенными субстратами и последующим денситометрическим анализом.

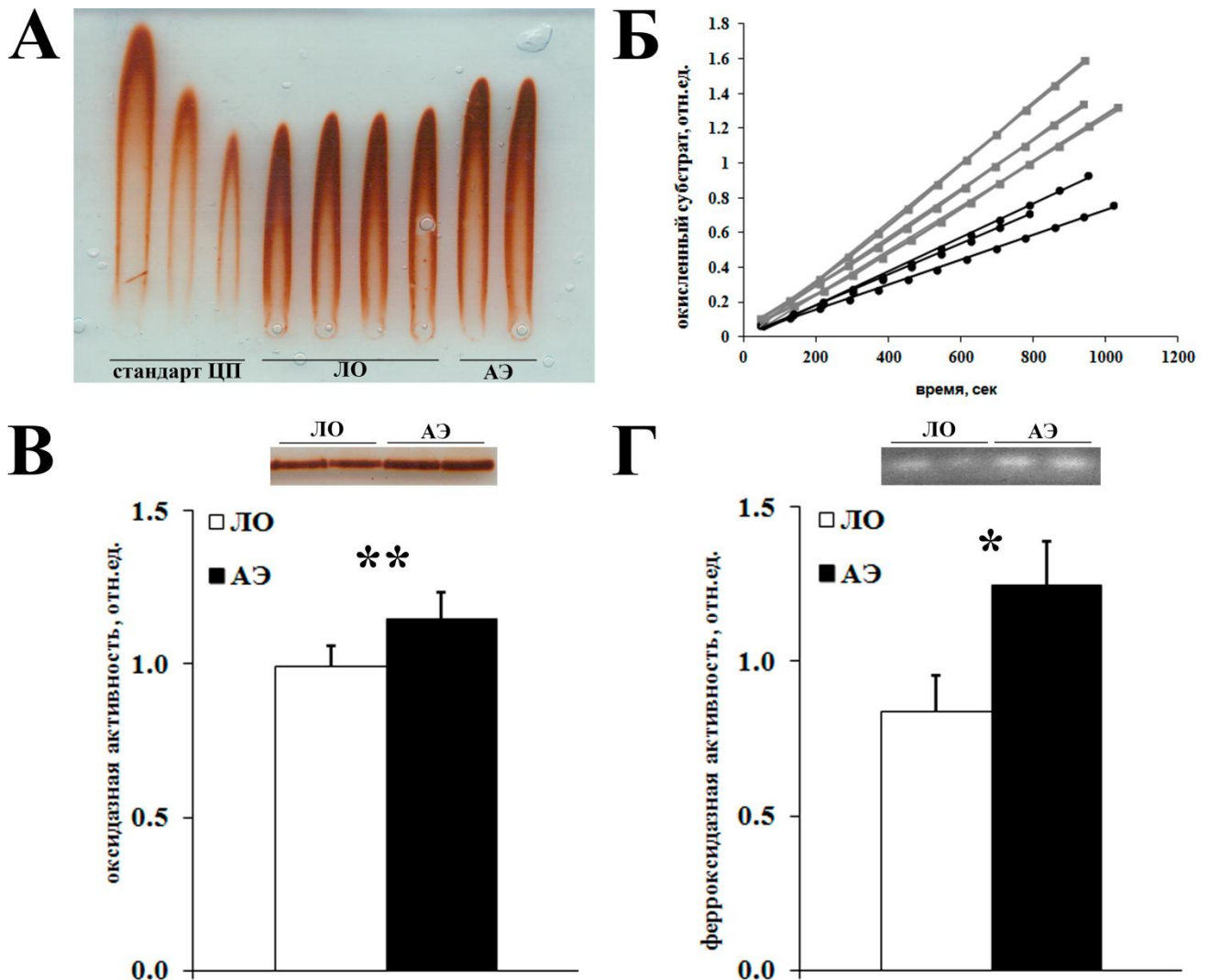


Рис. 3.3. Содержание и ферментативные активности ЦП в сыворотке крови ЛО и АЭ крыс.

А – ракетный иммуноэлектрофорез, гель окрашен орто-дианизидином. В качестве стандарта использован препарат ЦП крысы в количестве 0.56, 0.28, 0.14 мкг/мкл. Б – кинетика окисления орто-дианизидина. Черные линии – ЛО, серые линии – АЭ. В – оксидазная активность в ПААГ (n = 5). Сверху – пример геля, окрашивание орто-дианизидином. Г – ферроксидазная активность в ПААГ (n = 3). Сверху – пример геля, окрашивание ферроцином.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Изменение оксидазной активности также было оценено по скорости ферментативного окисления орто-дианизидина, катализируемого препаратами сыворотки крови крыс. Изменение оксидазной активности также было оценено по скорости ферментативного окисления орто-дианизидина, катализируемого препаратами сыворотки крови крыс. Показано, что АЭ приводит к повышению уровня как оксидазной (Рис. 3.3 Б, В), так и ферроксидазной (Рис. 3.3 Г) активности ЦП.

Концентрация МТ была определена в сыворотках крови животных методом иммуноблотинга с последующим денситометрическим анализом полученных рентгеновских пленок. Для проведения данного исследования были использованы первые антитела, специфически взаимодействующие со всеми формами МТ. Результаты показали, что АЭ приводит к повышению содержания МТ в сыворотке крови (Рис. 3.4).

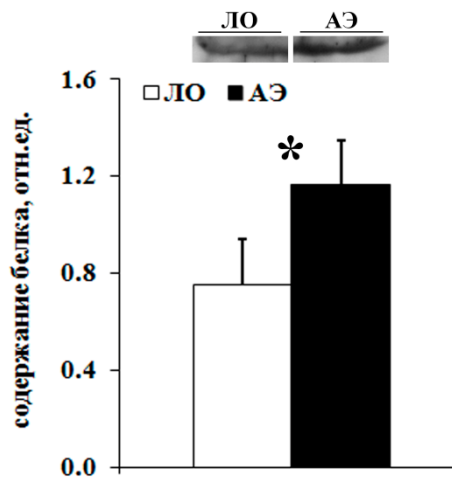


Рис. 3.4. Содержание белка МТ в сыворотке крови ЛО и АЭ крыс (n = 5).

Сыворотки крови крыс разделяли методом ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях, после чего методом иммуноблотинга визуализировали зоны, соответствующие белку МТ.

* $p < 0.05$.

Из представленных результатов можно сделать вывод, что АЭ приводит к существенным изменениям показателей статуса меди в сыворотке крови животных. Согласованное повышение уровня оксидазной и ферроксидазной

активностей ЦП, а также увеличение концентрации меди свидетельствуют, что большая часть ЦП в сыворотке крови находится в форме холо-фермента.

3.1.2. Изменение концентрации меди в органах и субклеточных фракциях печени АЭ крыс

На следующем этапе работы концентрация меди у АЭ крыс была измерена в печени (орган, определяющий статус меди в сыворотке крови, цель настоящего исследования) и сопоставлена с таковой для почек и гипоталамуса. Почки были выбраны потому, что их корковый и мозговой слои отличаются между собой содержанием митохондриального купроэнзима ЦО, так как в корковом слое нет гликолиза и очень интенсивное дыхание, а в мозговом слое – очень низкий уровень окислительного фосфорилирования, но интенсивный гликолиз. Следовательно, в корковом слое интенсивность метаболизма меди выше, чем в мозговом слое. К тому же, у взрослых млекопитающих почки не участвуют в поддержании баланса меди в организме. Гипоталамус был включен в ряд исследуемых органов потому, что в нем активен обмен меди из-за высокого уровня мозго-специфических купроэнзимов, участвующих в синтезе нейромедиаторов и процессинге нейропептидов. К тому же, в гипоталамусе синтезируется секреторный ЦП, содержание которого в желудочках мозга выше, чем в спинно-мозговой жидкости, что указывает на участие гипоталамуса в поддержании баланса меди в межклеточном пространстве мозга.

Из представленных данных видно, что АЭ приводит к увеличению концентрации меди в печени, корковом слое почек и гипоталамусе (Рис.3.5). Полученные в настоящем исследовании данные, показывающие, что в результате АЭ происходит накопление меди в печени, а в сыворотке крови повышается содержание холо-ЦП, полностью согласуются с немногочисленными данными литературы (*Gregoriadis and Sourkes, 1970; Prohaska et al., 1988*). Кроме того, Fields с соавторами отмечали, что спустя 6 недель после удаления надпочечников у крыс наблюдается увеличение размеров сердца, при этом масса тела АЭ крыс снижалась по сравнению с контрольными животными (*Fields et al., 1991*).

Известно также, что АЭ оказывает влияние на пролиферацию и дифференцировку сперматогенных клеток в семенниках, вызывая атрофию клеток Лейдига, уменьшение просвета семенных канальцев, нарушение сперматогенеза (*Nair et al., 1995*). Кроме того, в органах мужской половой системы крысы АЭ приводит к перераспределению меди: в придатках яичка и предстательной железе концентрация меди уменьшается, в то время как в семенниках – повышается (*Nair et al., 1995; 2001; 2002*).

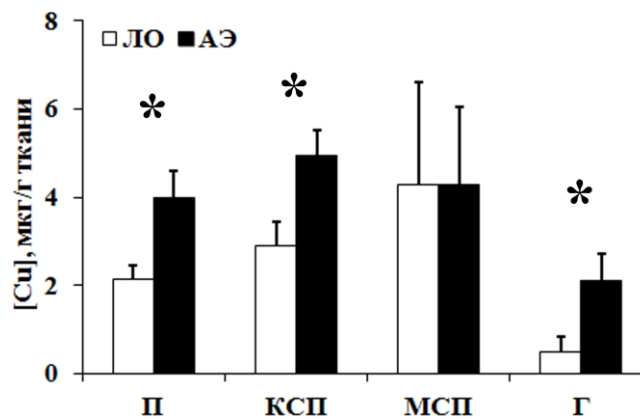


Рис. 3.5. Содержание меди в органах ЛО и АЭ крыс (n = 3).

П – печень, КСП – корковый слой почек, МСП – мозговой слой почек, Г – гипоталамус.
* $p < 0.05$.

Методом дифференциального центрифугирования были получены следующие субклеточные фракции печени крыс: ядра, митохондрии, фракция, обогащенная мембранами аппарата Гольджи, и цитозоль. Субклеточные фракции печени ЛО крыс были подвергнуты 20-часовому диализу. Данные, представленные на рисунке 3.6 А, показывают, что диализ не приводит к снижению концентрации меди в исследуемых фракциях. Следовательно, основная часть меди в компартментах ассоциирована с субстанциями, молекулярная масса которых превышает 800 Да, и находится в недиализуемой форме.

Далее было изучено внутриклеточное распределение меди между полученными фракциями органелл печени ЛО и АЭ крыс. Измерение концентрации меди показало, что АЭ приводит к снижению концентрации меди в

митохондриях, в то время как в цитозоле содержание меди увеличивается (Рис. 3.6 Б).

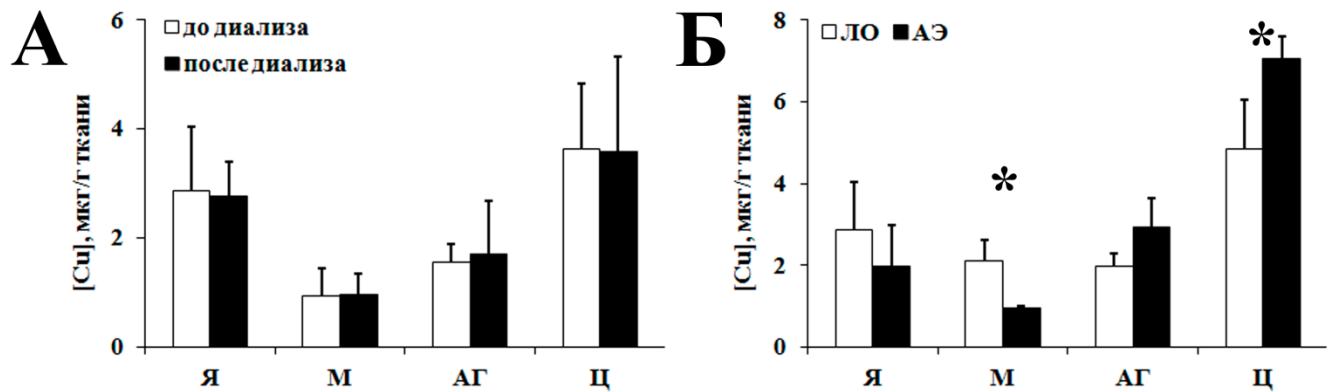


Рис. 3.6. Концентрация меди в субклеточных фракциях печени ЛО и АЭ крыс (n = 3).

А – концентрация меди в субклеточных компартментах печени ЛО крыс до и после диализа. Б – содержание меди в субклеточных фракциях печени ЛО и АЭ крыс. Я – ядра, М – митохондрии, АГ – аппарат Гольджи, Ц – цитозоль.

* $p < 0.05$.

3.1.3. Влияние АЭ на распределение меди в цитозоле гепатоцитов

Для того чтобы идентифицировать белки, связывающие медь в цитозоле гепатоцитов, было проведено разделение цитозоля на фракции методом гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G75. В каждой фракции было измерено поглощение при 280 и 254 нм (D_{280} и D_{254} , соответственно), а также содержание меди. Профили D_{280} совпадали у контрольных и АЭ крыс, поэтому на рисунке 3.7 приведены только данные, полученные на контрольных крысах.

Материал, поглощающий на 280 нм, элюировался четырьмя пиками: мажорные пики I и II, минорный пик III и пик IV. Пик III, содержащий белки с низким молекулярным весом, характеризуется увеличением поглощения на 254 нм, что свидетельствует о наличии в нем белков, обогащенных цистеином. Поглощение на 254 нм ярко выражено в пике IV, однако материал данного пика теоретически не должен содержать белковых компонентов, а только низкомолекулярные. Поэтому поглощение на 254 нм может быть объяснено присутствием глутатиона и/или нуклеотидов.

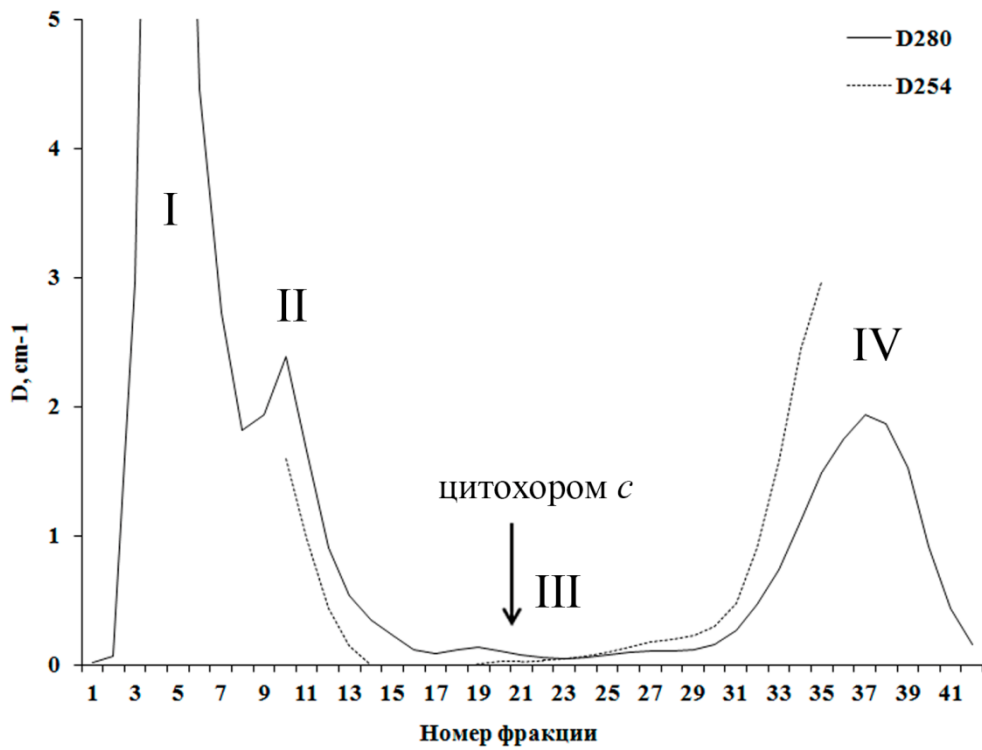


Рис. 3.7. Профиль элюции белков цитозоля клеток печени контрольных крыс. I, II, III и IV – номера пиков. Стрелка указывает на элюцию цитохрома *c*.

Определение концентрации меди во фракциях цитозоля ЛО крыс показало, что большая часть меди соответствует мажорным пикам I и II (Рис. 3.8).

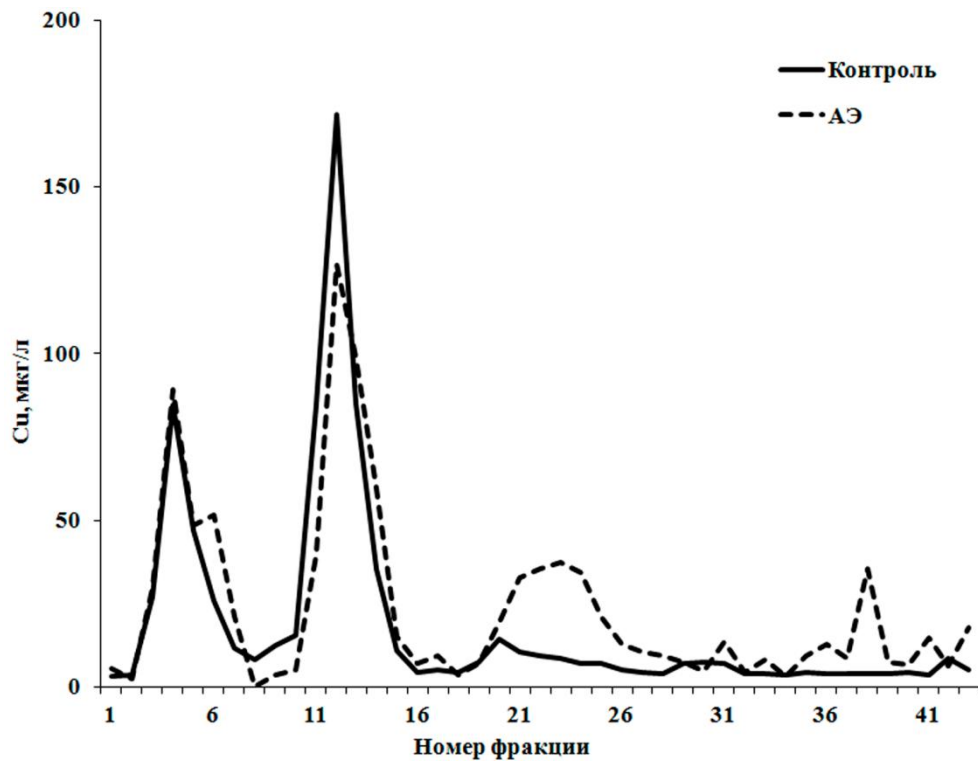


Рис. 3.8. Распределение меди по фракциям цитозоля печени ЛО и АЭ крыс.

В цитозоле АЭ крыс также значительная часть меди содержится во фракциях, принадлежащих мажорным пикам, однако значительно увеличивается содержание меди в пиках III и IV.

Для молекулярно-весового анализа были выбраны следующие фракции, соответствующие максимальному содержанию меди в пике: #5 (пик I), #13, #14 (пик II), #18, #20, #22, #25, #27 (пик III), #35 и #37 (пик IV) из цитозоля печени контрольных крыс; а также #5 (пик I), #17, #18 (пик II), #24, #27, #30, #31, #32 (пик III) и #53 (пик IV) из цитозоля печени АЭ крыс. Выбранные пробы были фракционированы методом ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях. После электрофореза белки были визуализированы в геле окрашиванием Кумасси G-250, либо гель был окрашен специфическими антителами на ЦП для выявления присутствия данного белка в исследуемых фракциях (Рис. 3.9). Видно, что пик I содержит основное количество полипептидов, молекулярная масса которых находится в диапазоне 10 – 220 кДа. Пик II включает полипептиды с молекулярной массой 10 – 40 кДа. Полипептиды пика III по молекулярному весу можно разделить на следующие группы: 10 – 25 кДа (восходящее плечо), 10 – 15 кДа (пик) и \approx 10 кДа (нисходящее плечо). В пике IV белковый материал обнаружен не был.

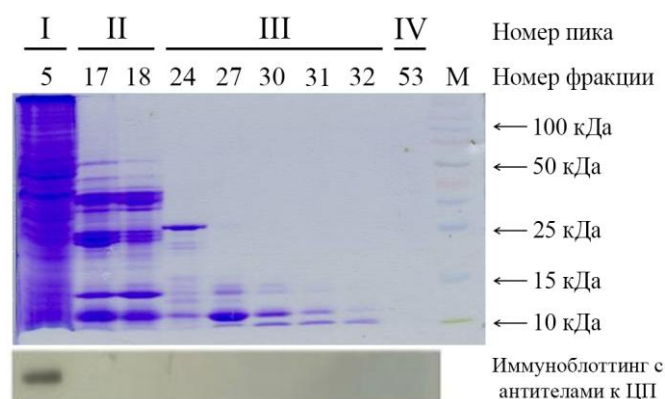


Рис. 3.9. Молекулярно-весовой анализ белков и содержание ЦП во фракциях цитозоля печени АЭ крыс.

Сверху – окрашивание геля Кумасси G-250. Снизу – иммуноблоттинг со специфическими антителами к ЦП. М – маркеры молекулярных весов.

Выбранные хроматографические фракции цитозоля контрольных и АЭ крыс разделили методом ПААГ в неденатурирующих условиях, после чего провели определение СОД активности в геле (Рис. 3.10).

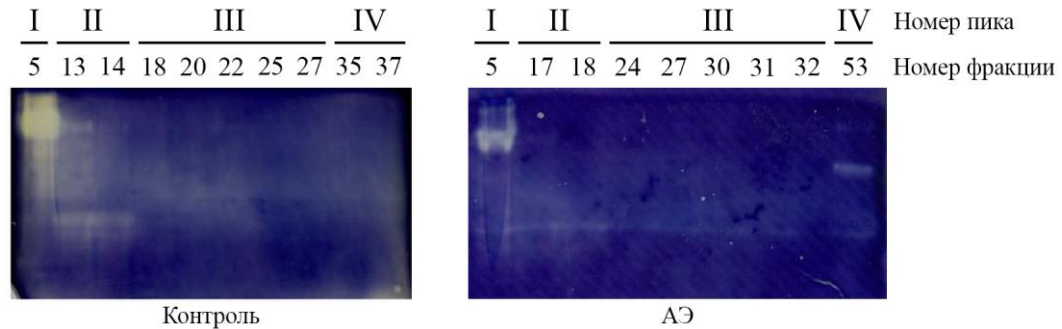


Рис. 3.10. СОД активность во фракциях цитозоля печени ЛО и АЭ крыс.

Основываясь на полученных данных можно предположить, что медь, содержащаяся в пике I, связана с белками сыворотки крови, которые могли попасть во фракции при гомогенизации образцов печени, загрязненных фрагментами кровеносных сосудов. Это предположение подтверждается результатами иммуноблотинга с антителами к ЦП, показавшими присутствие этого белка во фракции 5 (Рис. 3.9), а также присутствием СОД активности, зарегистрированной во фракции данного пика (Рис. 3.10). Она соответствует внеклеточной Cu/Zn-супероксиддисмутазе (СОД3, молекулярный вес гомотетрамера – 135 кДа, синтезируется клетками негепатоцитарного ряда). В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что концентрация меди во фракциях, соответствующих пику I не меняется у АЭ крыс (Рис. 3.8).

В соответствии с результатами определения СОД активности в геле, медь из пика II должна быть связана с цитозольным купроэнзимом СОД1 (молекулярный вес гомодимера – около 32 кДа). Активность СОД в пике II контрольных крыс выше, чем у АЭ животных (Рис. 3.10).

Содержание иммунореактивных полипептидов СОД1 и ее ферментативную активность определяли в общей фракции цитозоля, выделенной методом дифференциального центрифугирования. Относительное содержание белка СОД1 измеряли методом иммуноблотинга со специфическими антителами. Оценку

ферментативной активности СОД1 проводили тестированием в геле, она основана на окислении ферментом рибофлавина после электрофореза в неденатурирующих условиях. Результаты исследования показали, что АЭ не влияет на содержание полипептидов СОД1 в цитозоле гепатоцитов (Рис. 3.11). В то же время, активность СОД1 значительно ниже у АЭ крыс по сравнению с контрольной группой, что согласуется с представленными выше данными о снижении СОД активности и концентрации меди в хроматографических фракциях, соответствующих пику II (Рис. 3.8; 3.10).

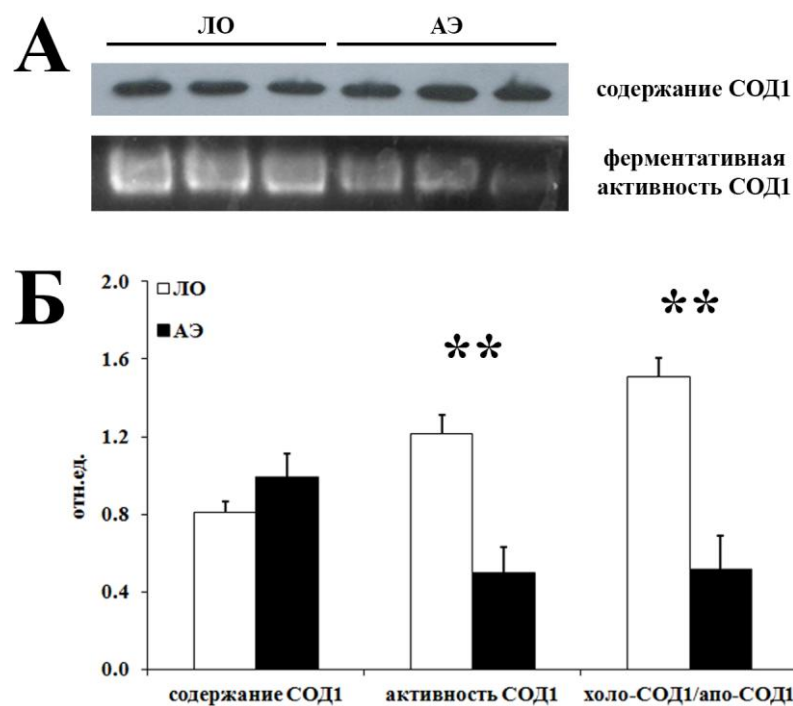


Рис. 3.11. Содержание и активность СОД1 в цитозоле печени ЛО и АЭ крыс (n = 3).

А – ПААГ, окрашенный специфическими антителами к СОД1 (сверху); ПААГ, окрашенный нитротетразолием синим для выявления ферментативной активности СОД1 (снизу). Б – денситометрический анализ представленных выше гелей (А) и отношение холо-СОД1/апо-СОД1.

** $p < 0.01$.

Из представленных данных также видно, что АЭ приводит к резкому падению соотношения холо-СОД1/апо-СОД1 в цитозоле клеток печени (Рис. 3.11 Б). Включение атомов меди в белок СОД1 происходит при помощи специального Cu(I)-шаперона CCS. Известно, что апо-CCS получает медь в межмембранном

пространстве митохондрий (*Leary et al., 2009*). Вероятно, уменьшение содержания меди в митохондриях, спровоцированное АЭ, приводит к наблюдаемому снижению содержания холо-СОД1.

Влияние АЭ на содержание цитозольных белков МТ и COMMD1

Хроматографический пик III цитозольной фракции гепатоцитов предположительно включает МТ, небольшой ~10 кДа белок на 30% состоящий из остатков цистеина, что объясняет увеличение поглощение в пике на 254 нм (Рис. 3.7). МТ является участником системы МТ-Cu(I)/глутатион/COMMD1-Cu(II), регулирующей количество меди, которое будет запасено в цитозоле, выведено из клетки, либо рекрутировано для последующего встраивания в купроэнзимы (*Kang, 2006; Lindeque et al., 2010; Vasak and Meloni, 2011*).

Для того чтобы оценить изменения в функционировании данной регуляторной системы, вызванные АЭ, был проведен анализ содержания полипептидов МТ и COMMD1 в общей фракции цитозоля печени ЛО и АЭ крыс. Цитозольная фракция была получена методом дифференциального центрифугирования как супернатант после центрифугирования в течение 1 часа при 23000×g пробы, предварительно очищенной от фракций ядер и митохондрий. Данные, приведенные на рисунке 3.12, показывают, что АЭ не вызывает изменения содержания данных белков в цитозоле гепатоцитов.

Известно, что одной из важных функций МТ является его функционирование в качестве внутриклеточного депо меди (*Palacios et al., 2011; Sutherland and Stillman, 2011*). Поэтому на следующем этапе исследования было проведено определение уровня нагрузки МТ медью. Для этого белок иммунопреципитировали из общей фракции цитозоля, после чего в полученных преципитатах была определена концентрация меди методом ААС. Результаты показывают, что содержание меди было выше во фракции МТ, преципитированной из цитозоля АЭ крыс (Рис. 3.13).

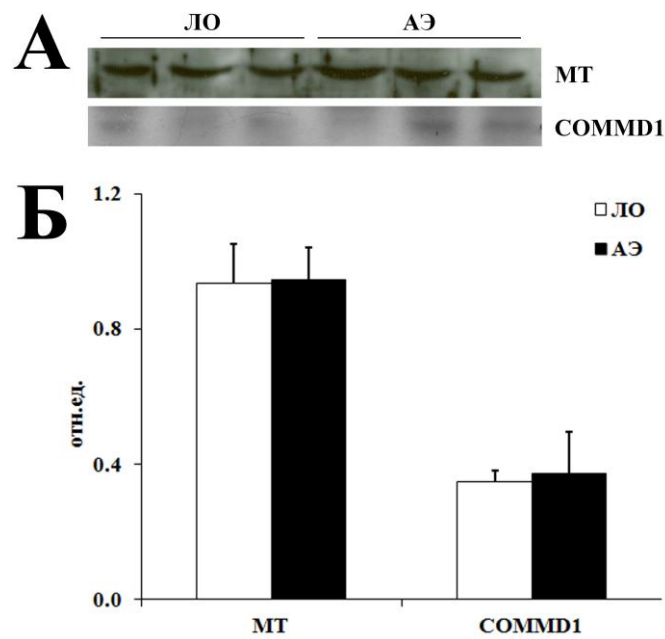


Рис. 3.12. Содержание МТ и COMMD1 в цитозоле печени ЛО и АЭ крыс (n = 3).

А – ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях и иммуноблотинга со специфическими антителами к МТ и COMMD1. Б – денситометрический анализ представленных выше гелей.

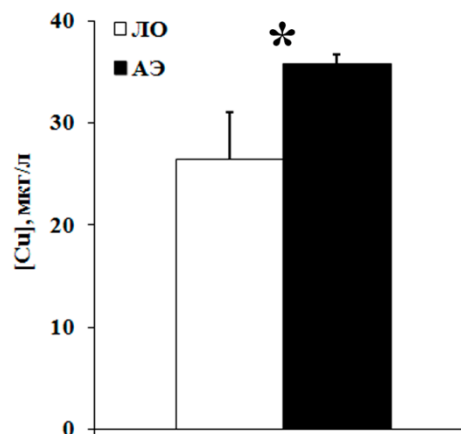


Рис. 3.13. Влияние АЭ на содержание меди, ассоциированной с МТ в цитозоле печени крыс (n = 5).

* p < 0.05.

Таким образом, увеличение содержания общего количества МТ-связанной меди при неменяющейся концентрации зрелых полипептидов указанного белка свидетельствует о том, что в результате адrenaлэктомии увеличивается удельное содержание атомов меди на молекулу МТ. Этот результат согласуется с представленными выше данными, показывающими, что в хроматографических фракциях, соответствующих пику III, из цитозоля печени АЭ крыс наблюдается

подъем содержания меди по сравнению с фракциями соответствующего пика контрольных крыс (Рис. 3.8).

Хроматографический пик IV из цитозоля АЭ крыс содержит компонент, обладающий СОД активностью

В IV пике содержание меди было немного выше фонового значения. Кроме того, у АЭ крыс в данном пике содержится неизвестный компонент, обладающий СОД активностью, однако у ЛО крыс подобный компонент не обнаружен (Рис. 3.10). После проведения ПААГ электрофореза в неденатурирующих условиях, гели были окрашены Кумасси G-250. Однако во фракциях, соответствующих пику IV, белкового компонента не было обнаружено ни в цитозоле АЭ крыс, ни у ЛО животных (Рис. 3.13).

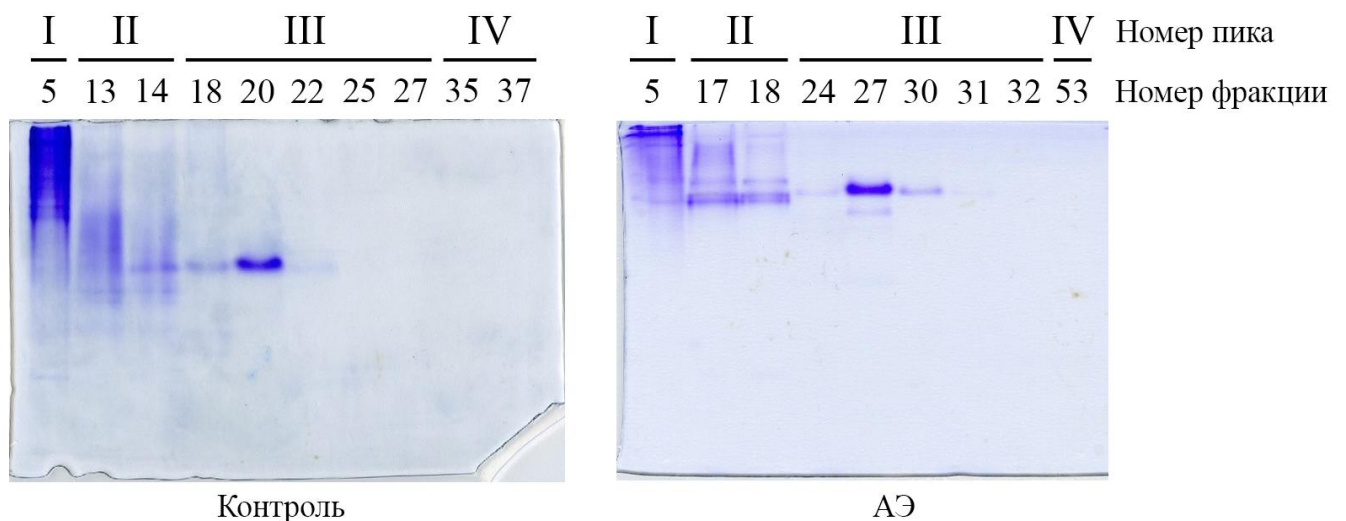


Рис. 3.14. Окрашивание хроматографических фракций цитозоля Кумасси G-250 после неденатурирующего электрофореза.

Фракции, соответствующие пику IV, разделили методом электрофореза в денатурирующих условия, гель окрасили нитратом серебра. Перед нанесением на ПААГ пробы обработали ДСН и/или β -меркаптоэтанолом (МЭ) и нагревали при 95 °С в течение 5 минут, либо инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Результаты показали, что обработка ДСН, МЭ и температурой

приводит к наиболее полной диссоциации взятого в исследование материала (Рис. 3.15).

Схожая картина наблюдается при исследовании фракции пика IV, полученной из цитозоля печени крысы, получавшей в течение долгого времени с пищей хлорид серебра (“Ag крысы”). Ионы серебра включаются в транспортные пути меди, так как Cu(I) и Ag(I) обладают идентичными координационными свойствами в отношении лигандов медь-связывающих мотивов Cu(I)-шаперонов, но серебро, в отличие от Cu(I) не способно изменять степень окисления и экскретироваться как Cu(II), поэтому его экскреция из гепатоцитов блокирована. Серебро накапливается вначале в митохондриях (Клотченко и др., 2008; Zatulovskiy et al., 2012), а при хроническом поступлении в организм – и в цитозоле (Plechova et al., 2014)

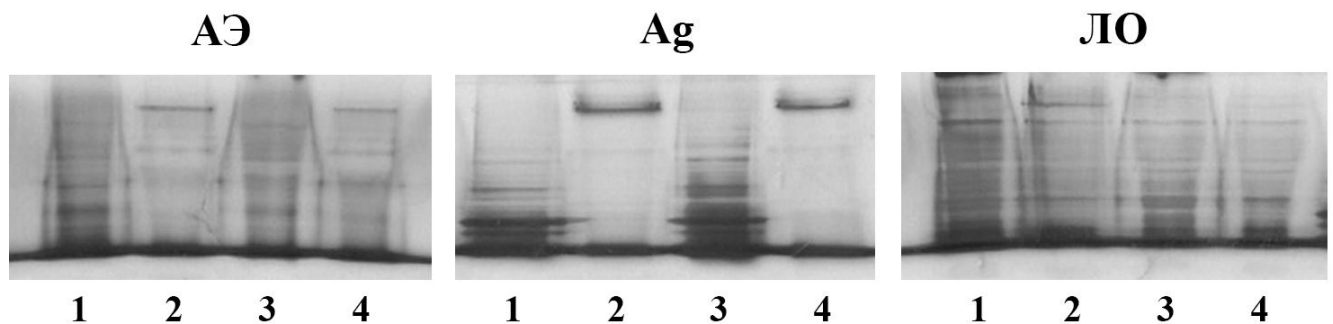


Рис. 3.15. ДСН-электрофорез фракций, соответствующих пику IV, выделенных из печени АЭ, Ag и ЛО крыс.

Денатурирующий электрофорез в 12% ПААГ фракций #53 (АЭ крысы), #40 (Ag крысы) и #35 (ЛО крысы), соответствующих пику IV. 1 – пробы обработали ДСН, МЭ и кипятили при 95 °С; 2 – пробы обработали ДСН и МЭ; 3 – пробы обработали ДСН и кипятили при 95°С; 4 – пробы обработали ДСН. Окрашивание геля нитратом серебра.

Природа вещества на данный момент не установлена. Можно думать, что это комплекс атомов меди с низкомолекулярными компонентами, возможно, полиглутатион, проявляющий СОД-подобную активность.

3.1.4. Исследование митохондриальной фракции гепатоцитов АЭ и контрольных крыс

Фракции митохондрий печени ЛО и АЭ крыс были изолированы общепринятым методом дифференциального центрифугирования как осадок после центрифугирования при $12000\times g$ в течение 20 минут постъядерного супернатанта. Разделение фракции митохондрий в ПААГ в денатурирующих условиях и последующий анализ методом иммуноблотинга показали, что в результате АЭ удельное содержание полипептидов белка СОХ4 не изменяется (Рис. 3.16).

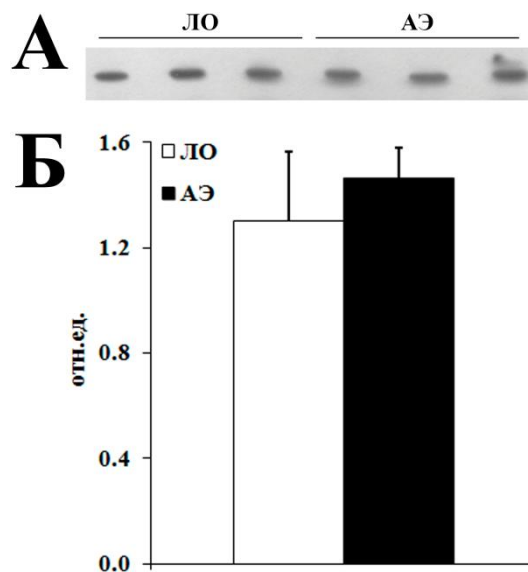


Рис. 3.16. Содержание СОХ4 в митохондриях печени ЛО и АЭ крыс ($n = 3$).

А – ПААГ после электрофореза в денатурирующих условиях и иммуноблотинга со специфическими антителами к СОХ4. **Б** – денситометрический анализ представленного геля.

Анализ протеомов митохондрий печени ЛО и АЭ крыс

Субклеточные фракции митохондрий и цитозоля были получены из гомогенатов печени крыс методом дифференциального центрифугирования, как описано ранее. Далее, фракции митохондрий были дополнительно очищены методом равновесного ультрацентрифугирования с сахарозной подушкой. Для этого каждая фракция была нанесена на раствор сахарозы (42%) и подвергнута ультрацентрифугированию при $58000\times g$ в течение ночи. После этого фракции,

прошедшие через сахарозную подушку, отобрали, развели в 4 раза гомогенизационным буфером (ГБ) и освободили от сахарозы центрифугированием при $15000 \times g$ в течение 30 минут. Анализ методом ПЦР со специфическими праймерами к митохондриальной ДНК (мтДНК) подтвердил, что очищенные фракции действительно содержат митохондрии (Рис. 3.17). Расчетный размер ПЦР-продукта составляет 518 пар нуклеотидов, однако в результате анализа были получены амплификаты размером около 600 п.н. Это несоответствие можно объяснить тем, что праймеры были подобраны на переменный участок мтДНК, длина которого варьирует у крыс различных линий.

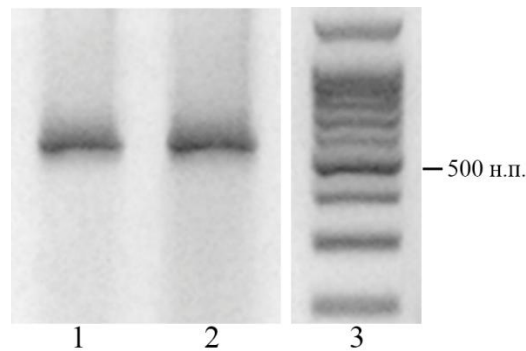


Рис. 3.17. Распределение митохондриальной ДНК в полученных фракциях.

1 – митохондрии печени ЛО крысы, 2 – митохондрии печени АЭ крысы, 3 – маркеры.

Иммуноблотинг фракций с антителами к митохондриальным белкам цитохрому *c* и СОХ4 показал, что изолированные фракции обогащены зрелыми специфическими митохондриальными белками (Рис. 3.18). При этом в цитозоле присутствует пре-пептид СОХ4, а цитохром *c* обнаруживается лишь в следовых количествах. Данные показывают, что полученные фракции митохондрий являются высокоочищенными.

Для того чтобы определить, оказывает ли АЭ влияние на протеом митохондрий крыс, митохондриальные фракции, выделенные из печени контрольных и АЭ животных, были проанализированы методом двумерного электрофореза (Рис. 3.19).

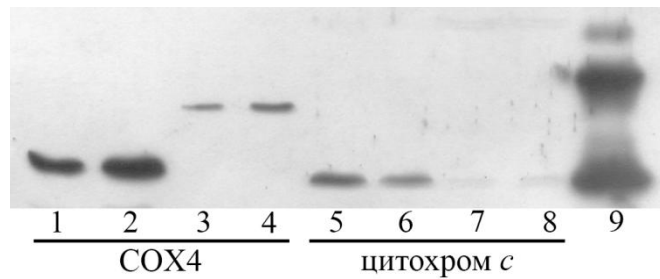


Рис. 3.18. Анализ чистоты полученной митохондриальной фракции методом иммуноблотинга.

Фракции были выделены из печени ЛО (1, 3, 5, 7) и АЭ (2, 4, 6, 8) крыс. 1, 2, 5, 6 – митохондрии; 3, 4, 7, 8 – цитозоль; 9 – коммерческий препарат цитохрома *c* лошади.

Эксперимент был повторен 3 раза. Общая картина распределения белков соответствует митохондриальному протеому. Кружками выделены участки, демонстрирующие различия протеомов АЭ и ЛО крыс.

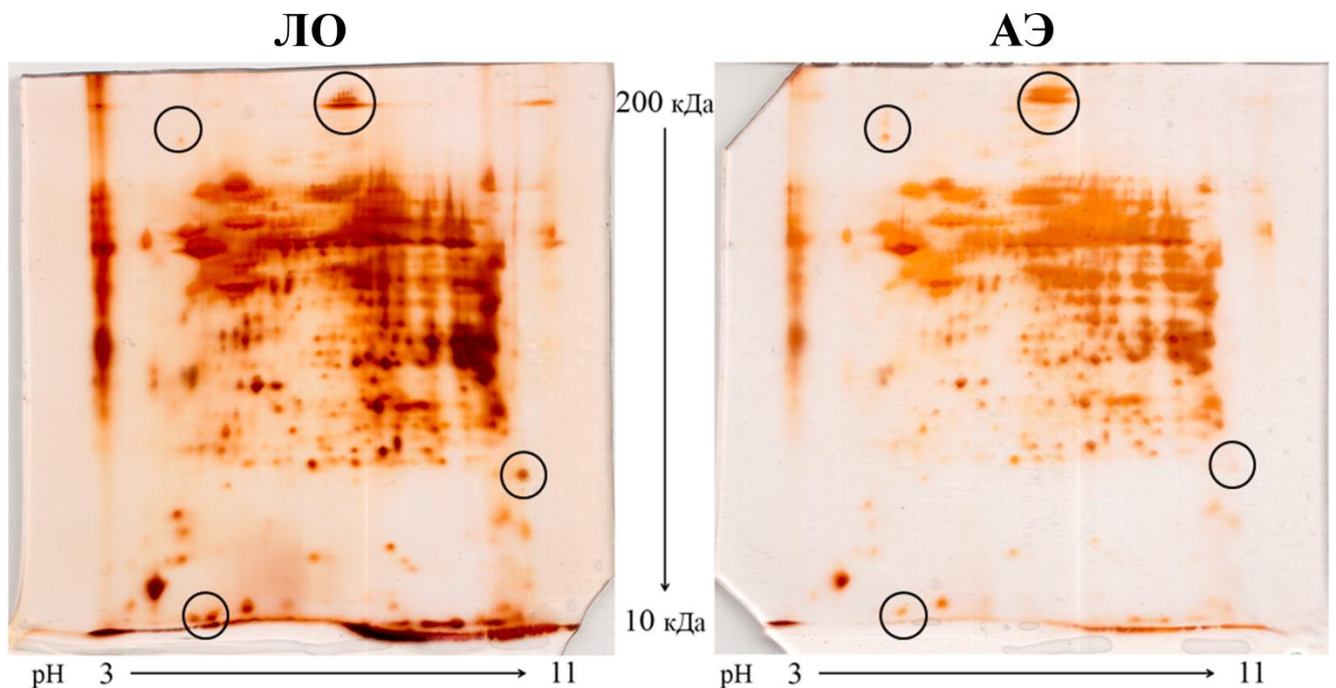


Рис. 3.19. Двумерный электрофорез митохондрий печени контрольных (слева) и АЭ (справа) крыс.

Изофокусировку проводили в области нелинейного градиента рН 3-11. Денатурирующий электрофорез проводили в 12% ПААГ. Гели были окрашены нитратом серебра. Черными окружностями обозначены обнаруженные различия протеомов.

На электрофореграммах отчетливо выявляются множественные различия. В частности, в области рН 8.5 – 9.0, молекулярный вес 30 – 35 кДа, АЭ крысы

теряют полипептид. В области рН 3.5 – 4.0, молекулярный вес 10 – 13 кДа, в митохондриях АЭ крыс утрачивается продукт. В области рН 4.0, молекулярный вес 130 кДа, у АЭ животных появляются три пятна. К тому же, в области рН 7, молекулярный вес около 200 кДа, в мажорной зоне выявляется значительная разница, состоящая в конфигурации зоны. В этих опытах мы использовали общепринятые способы очистки митохондрий. И хотя нам удалось однозначно показать, что АЭ влияет на полипептидный состав митохондрий, сделать более конкретные заключения не представлялось возможным. Поэтому мы предприняли попытку получить очищенные фракции митохондрий, предполагая, что митохондрии в печени крыс неоднородны, и представлены субпопуляциями, и АЭ может изменять соотношения между ними.

В предварительном эксперименте гомогенат печени взрослой интактной крысы был подвергнут центрифугированию при $800\times g$ в течение 10 минут. Полученный в результате центрифугирования постъядерный супернатант развели в 2 раза ГБ, нанесли на ступенчатый градиент сахарозы (27–42–45–47–50%) и центрифугировали при $58000\times g$ в течение 5 часов. После центрифугирования в градиенте была видна единая зона, содержащая митохондрии, однако 10 фракций объемом по 1 мл были отобраны так, что включали области выше и ниже этой зоны (Рис. 3.20 А).

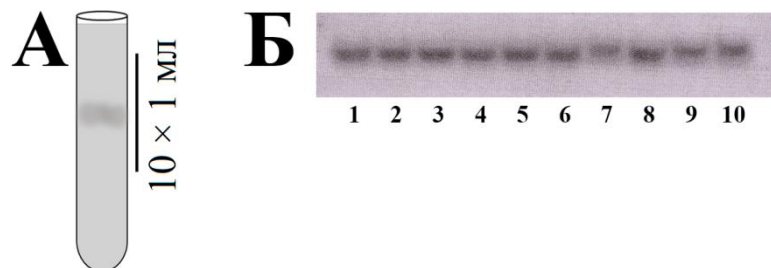


Рис. 3.20. Схема сбора фракций (А) и содержание мтДНК (Б) во фракциях митохондрий печени контрольной крысы.

1 – 10 номера фракций, отобранных из градиента сахарозы, начиная с верхней.

В полученных фракциях методом ПЦР определили присутствие мтДНК. Ожидали, что мтДНК будет обнаруживаться лишь в средних фракциях,

соответствующих видимой зоне в градиенте сахарозы. Но результаты анализа показали, что мтДНК содержится во всех отобранных фракциях (Рис. 3.20 Б).

Результат предварительного эксперимента подтвердил, что необходимо провести более тщательный анализ митохондриальной популяции печени контрольной крысы.

3.1.5. Влияние АЭ на гетерогенность популяции митохондрий печени крыс

В отсутствие сведений о существовании субпопуляций митохондрий вообще и влиянии АЭ на митохондрии печени в частности, мы выбрали следующий подход. Методом дифференциального центрифугирования гомогенат печени ЛО и АЭ крыс был разделен на грубую ядерную фракцию и грубую митохондриальную фракцию. Ядерная фракция была ресуспендирована в ГБ и нанесена на 2-ступенчатый градиент сахарозы (42–45%), после чего градиент был подвергнут центрифугированию в течение 1 часа при $36000 \times g$. Зона на границе 42-45% концентраций сахарозы была собрана в две фракции объемом по 1 мл: Я1 и Я2, соответственно “легкая” и “тяжелая” фракции митохондрий, седиментирующих с ядрами. Грубая фракция митохондрий была также ресуспендирована в ГБ, после чего фракционирована в ступенчатом градиенте сахарозы (27–41–42–43–44–45–47–50%) в течение 5 часов при $58000 \times g$. Результаты фракционирования представлены на рисунке 3.21.

Видно, что грубая митохондриальная фракция состоит из митохондрий с различной плотностью и распределяется от 41% до 45% сахарозы. По 12 фракций объемом 1 мл было собрано в этом диапазоне сахарозы из каждого градиента сахарозы: фракции 1 – 12 (Ф1 – Ф12). Каждая полученная фракция была разведена в 2 раза буфером ГБ, после чего митохондрии собрали центрифугированием и осадок ресуспендировали в одинаковом объеме ГБ (50 мкл).

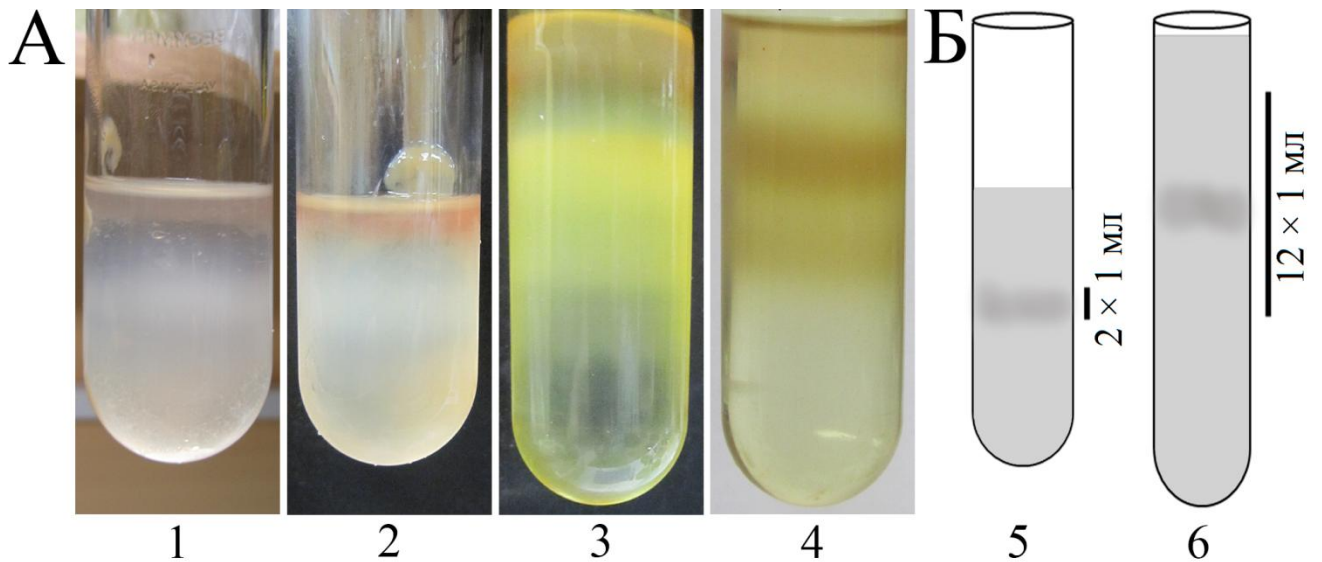


Рис. 3.21. Распределение митохондрий печени ЛО и АЭ крыс в ступенчатом градиенте сахарозы (А) и схемы отбора фракций (Б).

1, 2 – градиент сахарозы с пробами фракций Я1 – Я2; 3, 4 – ступенчатый градиент сахарозы с пробами фракции Ф1 – Ф12. 1, 3 – печень ЛО крысы; 2, 4 – печень АЭ крысы. 5 – схема отбора фракций Я1 – Я2, 6 – схема отбора фракций Ф1 – Ф12.

Концентрация белка была определена в каждой пробе спектрофотометрически по методу Бредфорд. Распределение по белку во фракциях митохондрий Ф1 – Ф12 представлено на рисунке 3.22.

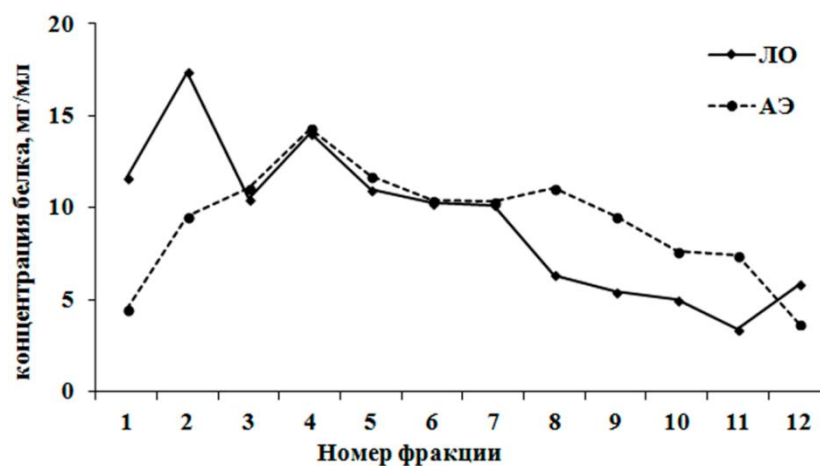


Рис. 3.22. Распределение белка в митохондриальных фракциях Ф1 – Ф12.

По оси абсцисс – номер фракции, начиная от 41% сахарозы.

Видно, что у АЭ животных существенно меньше содержание митохондрий низкой плотности. Обращает на себя внимание, что во фракции

низкоседиментирующих митохондрий тотальное содержание белка у ЛО животных почти в 2 раза выше, чем у АЭ крыс. “Легкая” и “тяжелая” фракции седиментирующих с ядрами митохондрий у ЛО животных представлены примерно в одинаковом количестве (Рис. 3.23). В то же время, у АЭ крыс “легкая” фракция превалирует над “тяжелой”.

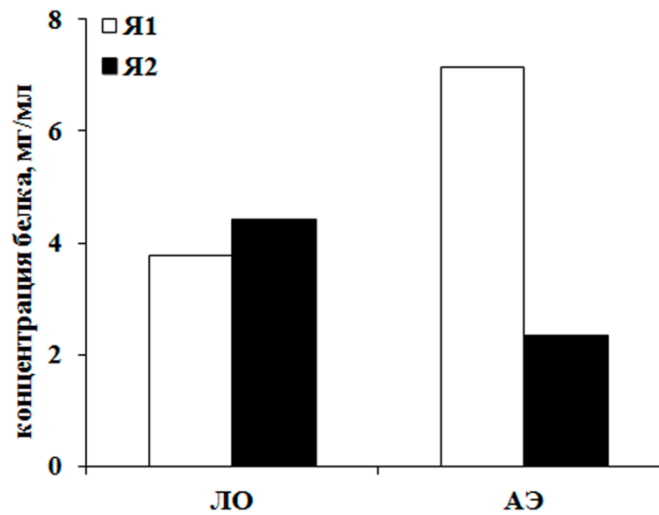


Рис. 3.23. Количественный анализ популяции митохондрий, ассоциированной с ядрами.

Все полученные фракции митохондрий были проанализированы методом иммуноблотинга с антителами к СОХ4 (рис. 3.24).

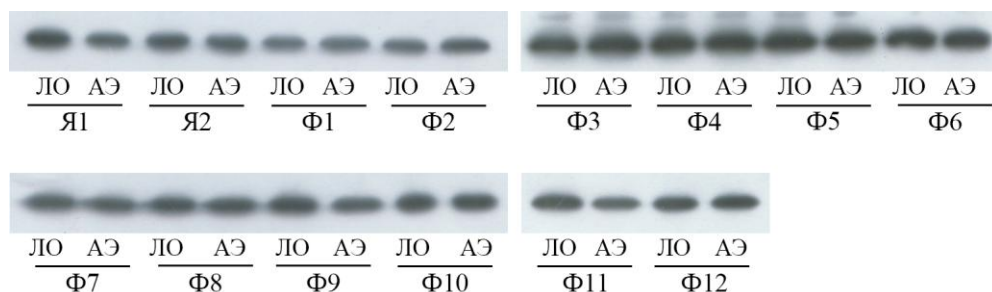


Рис. 3.24. Иммуноблотинг фракций митохондрий с антителами к СОХ4.

В этих же фракциях была проведена прямая реакция ПЦР со специфическими праймерами к мтДНК крысы. На рисунке 3.25 представлены результаты этого эксперимента.

Результаты показали, что некоторое количество митохондрий обнаруживается во фракции, седиментирующей при $800\times g$ и состоящей в основном из ядер и крупных фрагментов клеточных мембран.

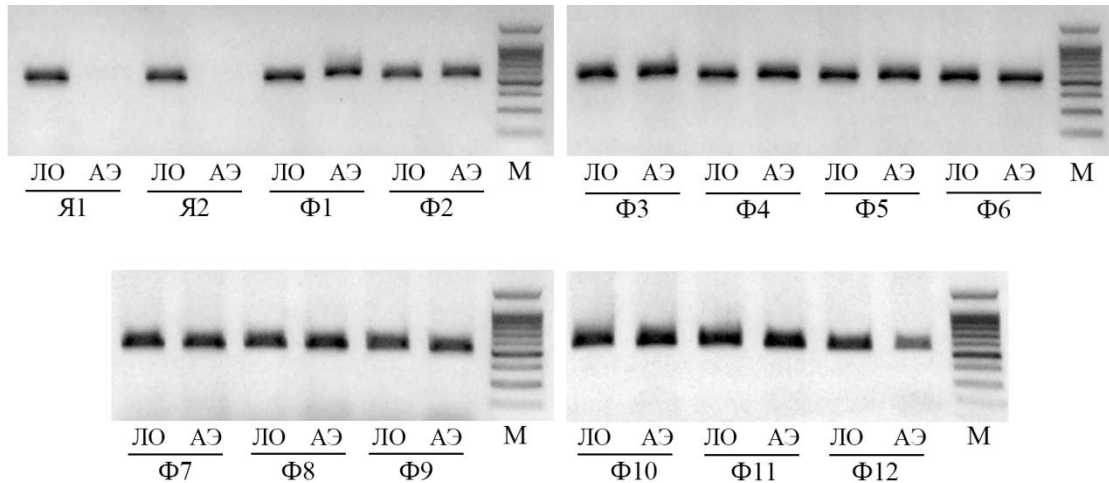


Рис. 3.25. Распределение мтДНК во фракциях митохондрий.

М – маркер.

Следует полагать, что митохондрии фракций Я1 и Я2 отличаются по своим морфологическим характеристикам от митохондрий, принадлежащих фракциям Ф1 – Ф12. Они могут иметь более крупные размеры, либо образовывать между собой комплексы, что позволяет им седиментировать при более низкой скорости центрифугирования.

На основе полученных данных о содержании мтДНК и белка СОХ4, компонента дыхательной цепи митохондрий, было определено отношение мтДНК/СОХ4 для исследуемых фракций (Рис. 3.26).

Анализ показывает, что митохондрии печени АЭ крыс, ассоциированные с ядрами, обеднены мтДНК. Результаты настоящего исследования свидетельствуют, что удаление надпочечников приводит к изменениям в соотношении митохондриальных субпопуляций печени, в частности, происходит снижение размеров субпопуляции митохондрий, седиментирующей с ядрами.

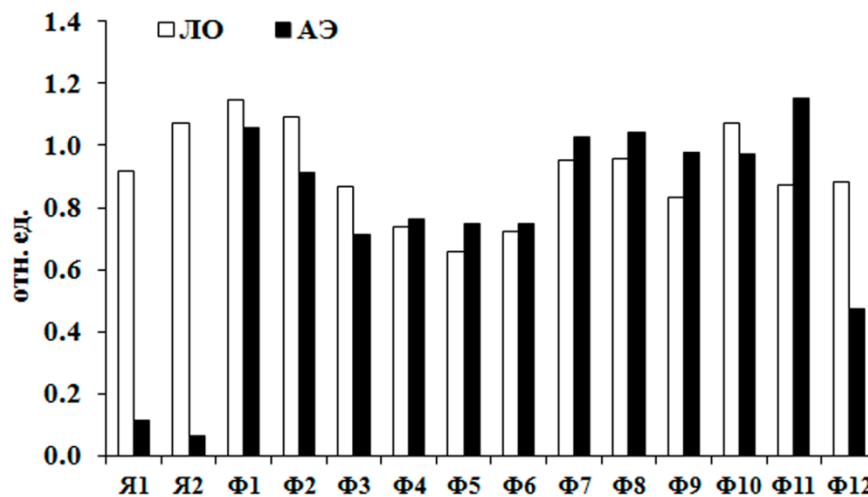


Рис. 3.26. Соотношение мтДНК/СОХ4 в анализируемых фракциях митохондрий.

На основании представленных данных можно сделать вывод, что, следуя стандартному протоколу получения митохондрий методом дифференциального центрифугирования как фракции, седиментирующей при $12000 \times g$, следует учитывать, что специфическая часть митохондриальной популяции, остается за рамками анализа. Полученные в данном разделе результаты являются заделом для дальнейшего исследования. Представляется важным разработать метод, позволяющий выделить все субпопуляции митохондрий и дать им подробную характеристику.

3.1.6. Исследование транскрипционной активности генов, кодирующих белки МСМ, в печени АЭ крыс

Надпочечники способны регулировать работу других органов путем секреции медиаторов и гормонов в кровоток. Так, мозговая зона надпочечников продуцирует катехоламины, которые секретируются в кровоток и регулируют работу других органов через взаимодействие с соответствующими адренергическими рецепторами, связанными с G-белком и действующими через аденилат-циклазы, продуцирующими cAMP, способную модулировать экспрессию генов, содержащих CRE последовательность (cyclic-AMP responsive element) в промоторной области (Milde et al., 2014). Помимо катехоламинов, продуктом эндокринной функции коры надпочечников являются также

глюкокортикоидные и минералокортикоидные гормоны. Из этих двух подклассов стероидных гормонов глюкокортикоиды, связываясь со специфическими растворимыми ядерными рецепторами, изменяют активность генов (*Mangelsdorf et al., 1995*), содержащих в промоторной области цис-элементы, называемые GRE (glucocorticoid-responsive element) (*Freedman, 1992*). Для того чтобы установить, контролируются ли гены MCM гормонами надпочечников, был проведен биоинформатический поиск CRE и GRE последовательностей в промоторных областях генов крысы, кодирующих белки, вовлеченные в метаболизм меди.

Поиск цис-элементов, регулируемых гормонами надпочечников, в промоторных областях генов, кодирующих белки MCM

В рассмотрение взяли гены, кодирующие белки следующих групп: транспортеры меди, купроэнзимы и белки, участвующие в депонировании меди в клетке.

Первую группу составили гены, кодирующие медь-транспортные белки:

Ctr1, кодирующий высокоаффинный универсальный импортер Cu(I), который осуществляет транспорт меди в клетки всех типов;

Ctr2, кодирующий низкоаффинный транспортер меди, сходный по структуре с CTR1. Когда CTR2 локализован на плазматической мембране, он импортирует Cu(I) в цитозоль, а будучи локализованным в лизосомах участвует в мобилизации меди из вакуолей, возможно, обеспечивая рециклизацию меди при ее дефиците;

Atp7a и *Atp7b*, гены двух Cu(I)-транспортных АТФаз P1 типа, локализованных в мембранах аппарата Гольджи, участвующих во встраивании меди в секреторные белки и в экскреции меди;

Ccs, ген Cu(I)-шаперона для СОД1, белковый продукт которого принимает атом меди из сайта на С-конце медь-транспортного белка CTR1 и встраивает в активный центр СОД1.

Гены второй группы кодируют купроэнзимы:

Cp, ген, продуктами которого являются главный секреторный ЦП, а также его сплайс-изоформа ГФИ-ЦП – белок, заякоренный в мембрану с помощью гликозилфосфатидинозитолового якоря. Секреторный ЦП сочетает в себе функции медь-транспортного белка, осуществляющего доставку ионов меди к клеткам негепатоцитарных рядов, и купроэнзима. ГФИ-ЦП участвует в мобилизации железа из клеток и проявляет антиоксидантную активность. Пары праймеров были подобраны таким образом, что позволяли селективно определять мРНК секреторной и заякоренной изоформ ЦП, а также пара праймеров *Cp*(2-4) позволяла выявлять одновременно мРНК обеих форм белка;

Sod1, ген, кодирующий убиквитический купроэнзим эукариотов Cu/Zn-супероксиддисмутазу (СОД1), участвующий в системе детоксикации активных радикалов в цитозоле всех типов клеток. В качестве сравнения была также оценена экспрессия гена *Sod2*, кодирующего митохондриальную медь-независимую Mn-СОД;

Cox4i1, ген изоформы 1 субъединицы IV ЦО, медь-связывающего белка, являющегося терминальным звеном цепи переноса электронов в митохондриях. Выбор субъединицы IV обусловлен тем, что гены, кодирующие I, II и III субъединицы комплекса ЦО расположены на митохондриальной ДНК, в то время как ген IV субъединицы имеет ядерное происхождение и содержит интроны, что позволяет подобрать специфические праймеры для проведения ОТ-ПЦР реакции. Кроме того, экспрессия данного гена строго коррелирует со сборкой и функционированием целого комплекса ЦО, поэтому по уровню активности этого гена можно судить об активности всей ЦО;

Ram, ген пептидилглицин α -амидирующей монооксигеназы, специфического купроэнзима нейроэндокринной системы и надпочечников, катализирует α -амидирование нейропептидов и пептидных гормонов.

Третью группу составили гены, продукты которых поддерживают внутриклеточный гомеостаз меди:

Mt1a, ген металлотионеина 1a, белка, связывающего на 1 молекулу примерно 6 – 8 атомов Cu(I). Эти атомы меди могут освобождаться глутатионом

(при этом восстанавливаться до Cu(II)) и поступать в купроэнзимы или связываться белком COMMD1.

Commd1, кодирующий цитозольный белок, мутации в котором приводят к накоплению меди в клетке. COMMD1 координирует медь в состоянии окисления Cu(II) и, помимо выведения меди участвует в различных клеточных процессах, в том числе и в сигналинге.

Поиск цис-элементов осуществляли на расстоянии 3000 п. н. upstream от +1 нуклеотида. Для поиска CRE использовали каноническую палиндромную 8-нуклеотидную CRE последовательность TGACGTCA (Montminy et al., 1986). С ней в промоторе ни у одного из перечисленных генов не обнаружено ни одного полного совпадения. В то же время, найдены последовательности, имеющие отличие в одном нуклеотиде (Таб. 3.1).

Таблица 3.1.

Гены, в промоторных районах которых обнаружены CRE-подобные последовательности

Ген	Координаты CRE	Совпадения
<i>Atp7a</i>	-2725...-2732	TGAC <u>C</u> TCA
<i>Atp7b</i>	-2440...-2447	TGACGT <u>T</u> A
<i>Ccs</i>	-342...-349	TGAG <u>G</u> GTCA
<i>Ccs</i>	-2897...-2904	TGAG <u>G</u> GTCA
<i>Cox4i1</i>	-1946...-1953	TGA <u>A</u> GTCA
<i>Cp</i>	-1157...-1164	TG <u>T</u> CGTCA
<i>Cp</i>	-2720...-2727	TGAC <u>A</u> TCA
<i>Sod1</i>	-225...-232	<u>C</u> GACGTCA
<i>Sod1</i>	-772...-779	TGAG <u>G</u> GTCA
<i>Sod1</i>	-1039...-1046	TGAC <u>T</u> TCA

Также было обнаружено больше ста 8-нуклеотидных последовательностей, отличающихся от канонической на 2 нуклеотида, причем около 40 из них располагались в пределах 1000 нуклеотидов выше кодирующего участка.

Как и в случае с CRE последовательностями, полных совпадений с каноническими GRE последовательностями GGTACANNNTGTTCT (*Beato, 1989*) и AGAACANNNTGTTCT (*Umesono and Evans, 1989*) обнаружено не было. Небольшое число последовательностей отличались от канонического GRE заменой одного или двух нуклеотидов (> 80% совпадения), но лишь две из них располагались в пределах 1000 нуклеотидов выше кодирующей последовательности (Таб. 3.2).

Таблица 3.2.

Гены, в промоторных районах которых обнаружены GRE-подобные последовательности

Ген	Координаты	Каноническая последовательность	Совпадения	Количество отличий
<i>Atp7a</i>	-1285...-1299	GGTACANNNTGTTCT	GGTACATCCTGT <u>A</u> CT	1
<i>Commd1</i>	-767...-781	GGTACANNNTGTTCT	GGTACAAGATC <u>T</u> T <u>T</u> T	2
<i>Mt2a</i>	-917...-931	AGAACANNNTGTTCT	AGAACACTA <u>C</u> G <u>A</u> TCT	2
<i>Mt2a</i>	-1139...-1153	AGAACANNNTGTTCT	AG <u>G</u> ACAGCCTGT <u>C</u> CT	2
<i>Mt2a</i>	-1248...-1262	AGAACANNNTGTTCT	AGAACAGGATGTT <u>T</u> T	1
<i>Sod1</i>	-1406...-1420	AGAACANNNTGTTCT	AGAACATGC <u>A</u> GTT <u>T</u> T	2
<i>Mt2a</i> (human)	-844...-858	AGAACANNNTGTTCT	AG <u>G</u> ACAGCCTGT <u>C</u> CT	2
<i>Mt2a</i> (human)	-975...-989	AGAACANNNTGTTCT	AGAACAGGATGTT <u>T</u> <u>A</u>	2

Интересно, что промоторная область человеческого гена, кодирующего *Mt2a*, также содержит два неполных совпадения с канонической последовательностью, с отличием в две однонуклеотидные замены каждое (Таб. 3.2). Ранее было показано, что экспрессия гена *Mt2a* человека регулируется

глюкокортикоидами (*Karin and Herschman, 1979*). Этот ген был взят в рассмотрение по данным проведенного биоинформатического поиска.

Исследование транскрипционной активности генов, кодирующих белки МСМ, в печени ЛО и АЭ крыс

Экспрессия генов, кодирующих белки, ассоциированные с метаболизмом меди, была оценена на уровне транскрипции методом полуколичественного ОТ-ПЦР анализа. Результаты исследования показали, что АЭ не приводит к изменению уровней экспрессии генов, кодирующих белки метаболизма меди (Рис. 3.27).

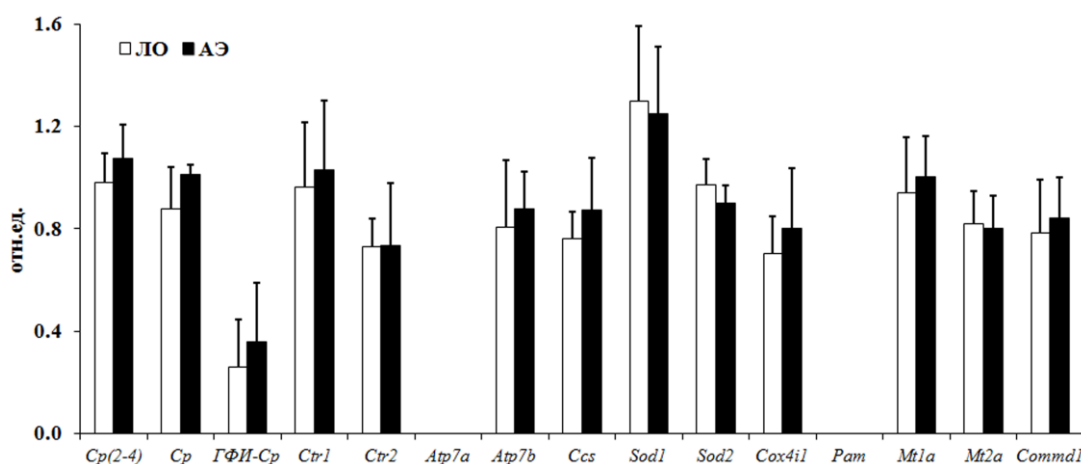


Рис. 3.27. Экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом меди, в печени ЛО и АЭ крыс (n = 5).

АЭ не оказывает влияния экспрессию генов, связанных с метаболизмом железа

Метаболизм меди тесно связан с метаболизмом железа, поэтому в настоящем исследовании была оценена активность генов, кодирующих транспортеры железа:

Fth1 и *Ftl*, соответственно гены тяжелой и легкой цепей ферритина, белка, исполняющего роль основного внутриклеточного депо железа. Тяжелая цепь ферритина содержит ферроксидазный сайт, в то время как легкая цепь отвечает за фолдинг белкового комплекса;

Tf, ген трансферрина, белка плазмы крови, осуществляющего функцию переноса ионов трехвалентного железа;

Tfrc, ген рецептора трансферрина, белка плазматической мембраны, отвечающего за импорт железа в клетку с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Результаты ОТ-ПЦР анализа показывают, что АЭ не изменяет активность генов, ассоциированных с метаболизмом железа (Рис. 3.28).

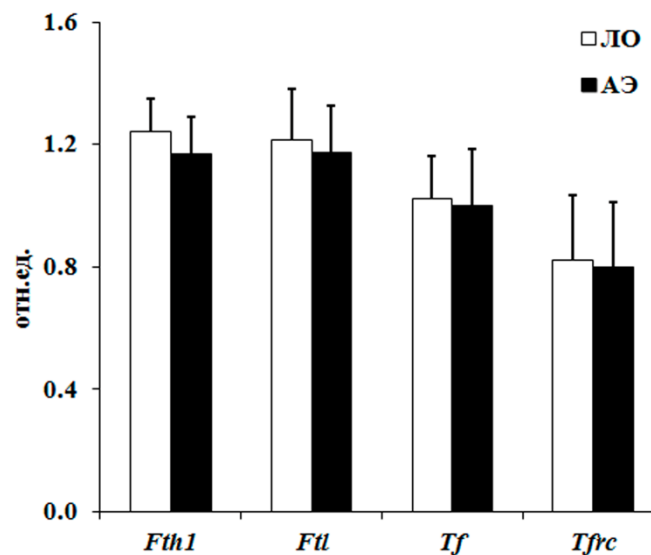


Рис. 3.28. Экспрессия генов, кодирующих белки, ассоциированные с метаболизмом железа, в печени ЛО и АЭ крыс (n = 5).

В совокупности, полученные в этом разделе данные показывают, что 1) АЭ приводит к накоплению меди в цитозоле в составе МТ и в субстанции неустановленной природы; 2) АЭ в митохондриях вызывает снижение концентрации меди, не связанной с ЦО, и изменяет соотношение между субпопуляциями митохондрий; 3) АЭ снижает уровень металлирования СОД1; 4) протеом митохондрий АЭ крыс отличается от такового у ЛО животных; 5) формирование холо-ЦП в цистернальном пространстве аппарата Гольджи увеличивается. Ни одно из этих изменений не связано с изменением активности генов, ассоциированных с метаболизмом меди.

3.2. Характеристика метаболизма меди в надпочечниках

Представленные выше данные об изменениях метаболизма меди в печени АЭ крыс свидетельствуют, что между механизмами поддержания гомеостаза меди в печени и надпочечниками существует связь. Можно предположить, что надпочечники через неизвестный механизм влияют на внутриклеточное распределение меди в гепатоцитах и ее экскрецию через желчь. Для того чтобы изучать фундаментальные основы этого механизма, необходимо иметь представление о том, как осуществляется метаболизм меди в надпочечниках. Понимание этого механизма представляется важной фундаментальной задачей. Кроме того, необходимо понять, какие изменения претерпевает метаболизм меди в надпочечниках на ранних этапах онтогенетического развития. Однако в литературе отсутствуют какие-либо данные, касающиеся этого вопроса. Исключение составляет работа Fazekas и соавторов, в которой доложен факт, что в надпочечниках эмбрионов концентрация меди выше, чем у взрослых (*Fazekas et al., 1963*).

Вторая часть диссертационного исследования сосредоточена на выявлении особенностей метаболизма меди в надпочечниках и печени крыс на ранних этапах постнатального развития.

3.2.1. Концентрация меди в печени и надпочечниках крыс в период раннего постнатального развития

Концентрацию меди в печени и надпочечниках определяли у крыс с 1-го по 15-ый дни жизни, также концентрация меди была измерена в печени крыс в 1 и 4 дни до рождения (Рис. 3.29). Представленные данные демонстрируют, что прогрессивное накопление меди в печени крыс начинается в эмбриональном периоде и продолжается до 12-го дня постнатального развития включительно, после чего концентрация меди резко снижается до уровня, характерного для взрослых животных.

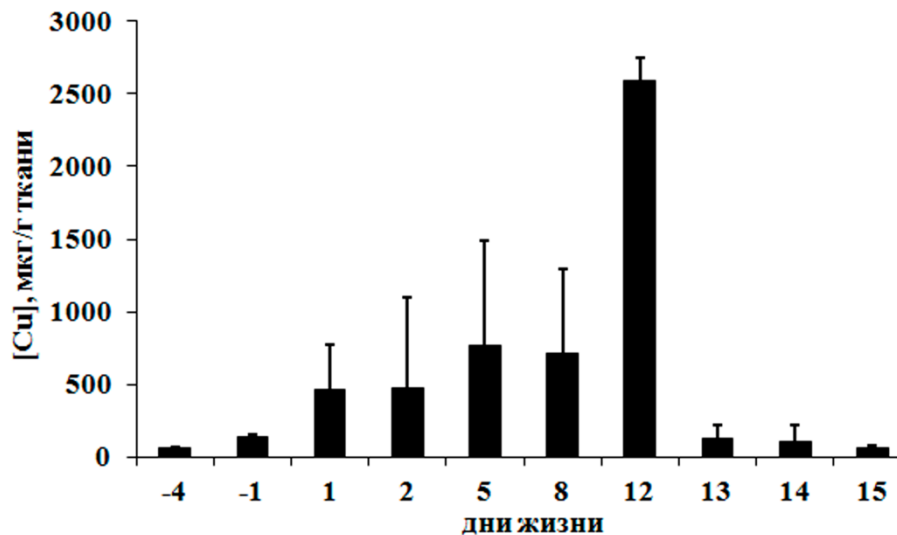


Рис. 3.29. Изменение содержания меди в печени крыс в период раннего онтогенетического развития ($n = 3$).

По оси абсцисс: дни жизни до рождения (-4; -1) и после рождения (1-15).

Эти данные хорошо согласуются с существующей концепцией эмбрионального и взрослого типов метаболизма меди в печени крыс. Согласно данному представлению, до 13-го дня жизни в печени крыс сохраняется ЭТММ, который характеризуется накоплением меди в печени. Начиная с 13-го дня жизни, медь перестает аккумулироваться в печени, и начинается ее выведение через желчь. Таким образом, происходит переключение на ВТММ (*Hurley et al., 1980*).

Из гепатоцитов крыс на ранних сроках постнатального онтогенеза методом дифференциального центрифугирования были получены внутриклеточные фракции. Далее, грубая митохондриальная фракция была разделена на митохондрии, лизосомы и пероксисомы при помощи ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы. Измерение содержания меди в полученных фракциях показало, что в течение ЭТММ происходит перераспределение меди между компартментами клеток печени (Рис. 3.30). Так, в течение первых дней жизни, медь аккумулируется в ядрах, но после 5-го дня происходит снижение концентрации меди в ядерной фракции. В то же время, содержание меди в митохондриях увеличивается, достигая максимального значения к концу периода ЭТММ.

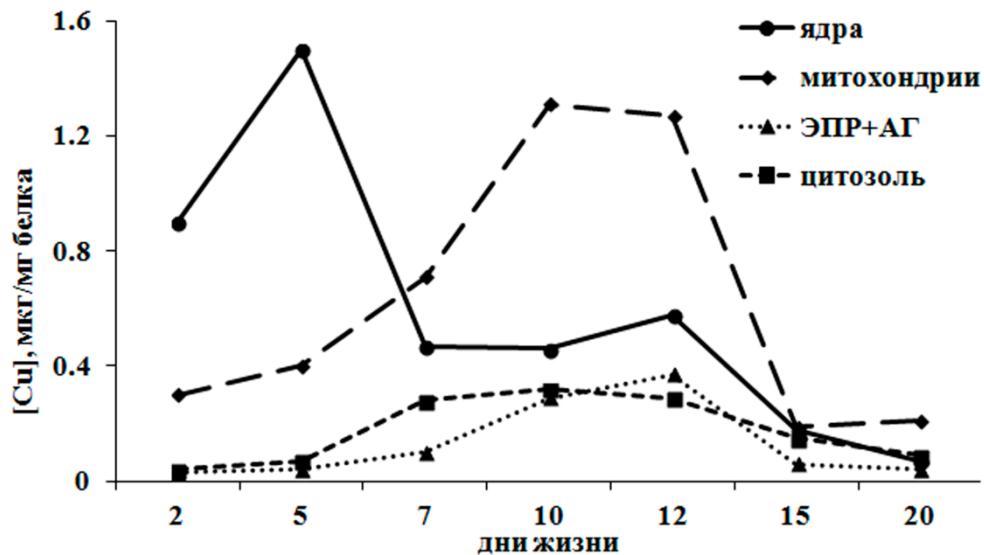


Рис. 3.30. Распределение меди в гепатоцитах новорожденных крыс ($n = 3$).

(Данные получены совместно с Платоновой Н.А. и Самсоновым С.А.)

По оси абсцисс: дни жизни после рождения. ЭПР – эндоплазматический ретикулум, АГ – аппарат Гольджи.

Сравнение концентрации меди в митохондриях, лизосомах и пероксисомах показало, что очищенная фракция митохондрий содержит около 90% меди из грубой митохондриальной фракции. Полученные данные позволяют рассматривать митохондрии как органеллу, выполняющую функцию запасания меди в течение ЭТММ. С 5-го по 12-ый дни постнатального развития происходит также увеличение содержания меди в цитозоле и фракции внутриклеточных мембран, причем динамика изменения концентрации меди в этих органеллах практически совпадает с таковой для митохондрий (Рис. 3.30). Резкое падение концентрации меди во фракциях митохондрий, цитозоля и внутриклеточных мембран происходит на 13-ый день жизни, в момент переключения на ВТММ.

Сведения о механизмах импорта меди в митохондрии и экскреции из них практически отсутствуют. Возможно, импорт меди осуществляется белком Pic2, принадлежащим к семейству митохондриальных переносчиков (*Vest et al., 2013*). Экскреция меди может происходить при помощи митохондриальной изоформы АТР7В, которая образуется в результате посттрансляционной модификации, заключающейся в отрезании фрагмента размером ~20 кДа от N-конца

полноразмерной АТР7В (*Lutsenko and Cooper, 1998*). Донором меди для Рс2 и митохондриальной АТР7В может служить эукариотический внутриклеточный низкомолекулярный переносчик меди Cu(I), способный перемещаться между митохондриями и цитозолем (*Cobine et al., 2006; Dodani et al., 2011*). Возможно также, что функцию переносчика меди выполняет 2-кДа белок SCC (small copper carrier), обнаруженный в сыворотке и моче пациентов на поздних стадиях болезни Вильсона (*Gray et al., 2012*). На данный момент биологический смысл внутриклеточного перераспределения меди при переключении ЭТММ на ВТММ остается неясным.

В отличие от печени, снижение содержания меди в надпочечниках начинается сразу после рождения (Рис. 3.31 А). При рождении концентрация меди в надпочечниках почти в 50 раз ниже, чем в печени, но уже к 5-му дню жизни происходит ее снижение на ~40%, после чего концентрация меди приближается к уровню, характерному для взрослых животных. Надпочечники взрослых крыс содержат 4 – 5 мкг меди на мг ткани, что примерно в 4 – 5 раз ниже, чем концентрация меди в печени взрослых животных.

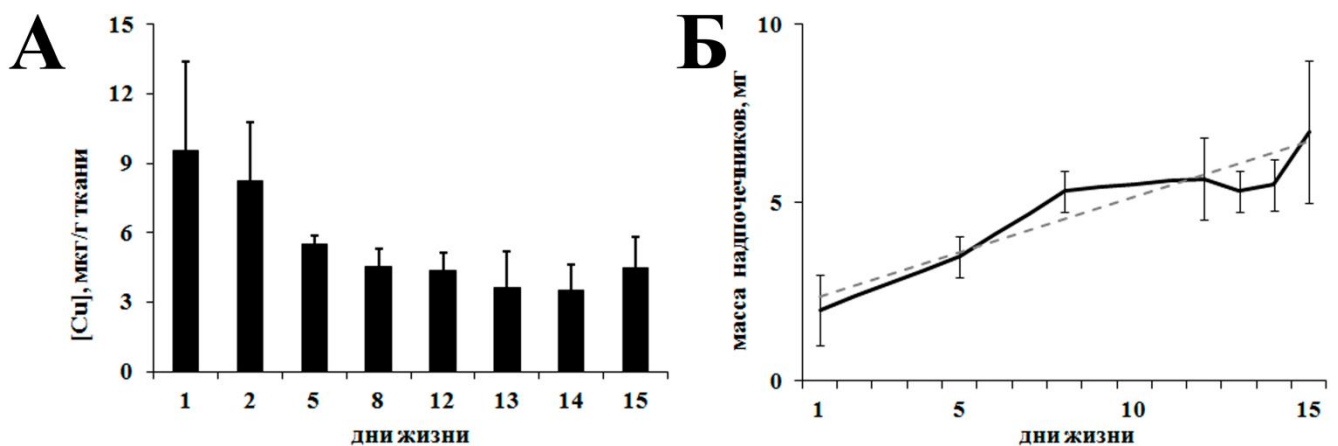


Рис. 3.31. Изменение концентрации меди в надпочечниках (А) и их массы (Б) у крыс в период раннего онтогенетического развития ($n = 3$).

Сравнение скорости роста надпочечников (Рис. 3.31 Б) и содержания в них меди позволяет предположить, что снижение концентрации меди может быть

следствием увеличения массы самих надпочечников, в то время как абсолютное количество меди в них остается неизменным.

3.2.2. Статус меди в сыворотке крови крыс в период раннего постнатального развития

В сыворотках крови новорожденных крыс были измерены следующие показатели статуса меди, определяемые метаболизмом меди в печени: концентрация меди, уровень иммунореактивных полипептидов ЦП, оксидазная и ферроксидазная активности ЦП, содержание полипептидов МТ, а также количество атомов меди, ассоциированных с белками ЦП и МТ.

Как видно из представленных данных (Рис. 3.32), в сыворотке крови не происходит увеличения содержания иммунореактивных полипептидов ЦП сразу после падения уровня меди в печени. Концентрация ЦП, характерная для ВТММ, достигается только к 40-му дню жизни.

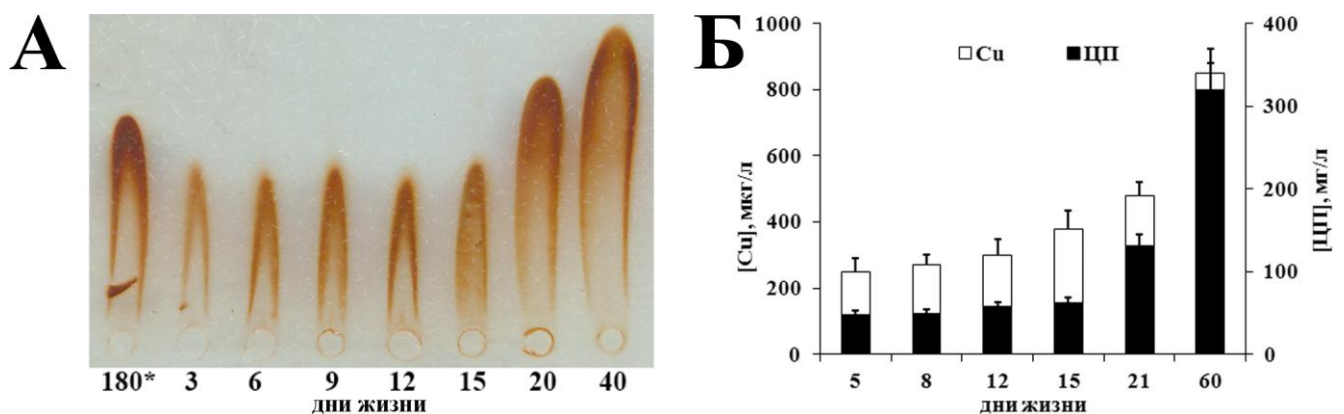


Рис. 3.32. Содержание меди и ЦП в сыворотке крови крыс на ранних сроках постнатального онтогенеза.

А – Количественный иммуноэлектрофорез сыворотки крови крыс с антителами к ЦП. Гель после иммуноэлектрофореза окрашивали орто-дианизидином для выявления оксидазного ЦП. *Сыворотка крови взрослой крысы (180 дней жизни) разбавлена в 2 раза. **Б** – Содержание меди (по данным ААС) и ЦП (по данным иммуноэлектрофореза) в сыворотке крови крыс в раннем постнатальном онтогенезе ($n = 3$). Концентрацию ЦП вычисляли по данным иммуноэлектрофореза как площадь области, соответствующей оксидазному ЦП. Для построения калибровочной кривой использовали растворы очищенного препарата ЦП крысы с известными концентрациями белка.

Увеличение оксидазной и ферроксидазной активностей (Рис. 3.33) ЦП соответствует динамике изменения содержания иммунореактивных полипептидов этого белка, что позволяет сделать вывод, что основная часть сывороточного ЦП представлена холо-ЦП.

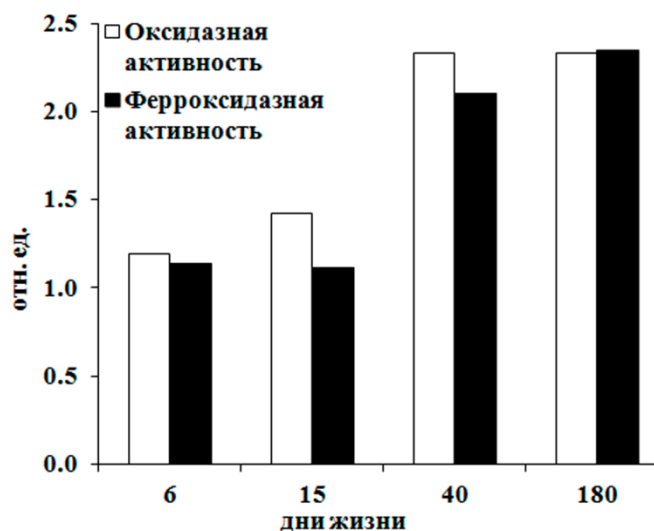


Рис. 3.33. Оксидазная и ферроксидазная активности ЦП в сыворотке крови крыс на раннем этапе постнатального онтогенеза (n = 3).

Для определения оксидазной и ферроксидазной активностей ЦП гель после неденатурирующего электрофореза инкубировали с орто-дианизидином или ферроцином, соответственно, после чего проводили денситометрический.

Концентрация меди в сыворотке крови также повышается, что согласуется с увеличением ферментативно активного ЦП (Рис. 3.32 Б). В то же время, новорожденные крысы характеризуются почти в 2 раза более высоким отношением концентрации меди к содержанию ЦП (Рис. 3.32 Б). Это означает, что молекула ЦП новорожденных связывает больше атомов меди и/или у новорожденных в сыворотке крови присутствует другой переносчик меди.

Сыворотка крови крыс, находящихся в периоде ЭТТМ, была фракционирована методом гель-фильтрации, после чего в полученных фракциях измерили поглощение при 280 нм и концентрацию меди. Как видно из представленных данных, большая часть меди сосредоточена во фракции, содержащей высокомолекулярные компоненты (Рис. 3.34). По результатам определения оксидазной активности, эта фракция соответствует пику белка ЦП.

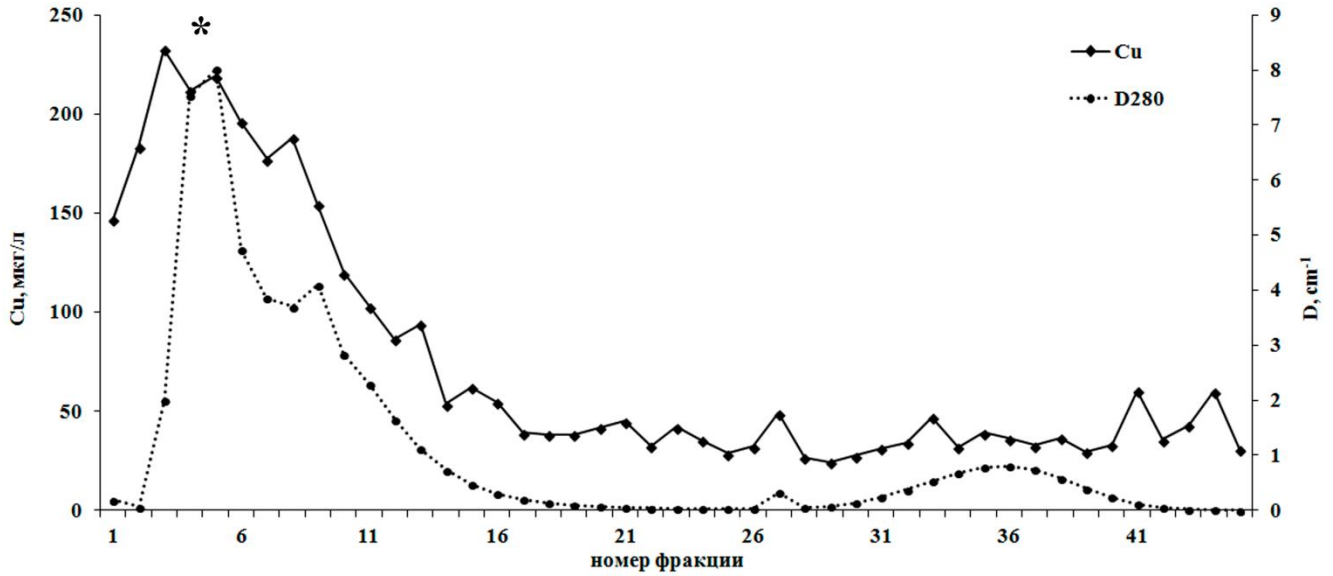


Рис. 3.34. Гель-фильтрация сыворотки крови крысы, 6-ой день жизни.

* фракции, характеризующиеся оксидазной активностью.

На следующем этапе из сывороток крови 6-ти дневных и взрослых крыс иммунопреципитировали фракцию ЦП. Определение концентрации меди показало, что основная часть сывороточной меди ассоциирована с ЦП, причем как у крыс в период ЭТТМ, так и у взрослых крыс (Рис. 3.35).

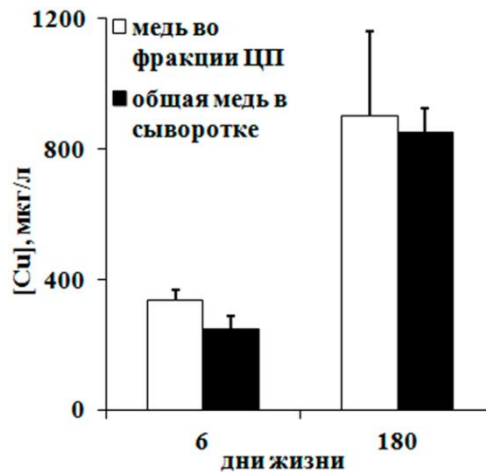


Рис. 3.35. Содержание меди в сыворотке крови и во фракции ЦП новорожденных и взрослых крыс (n = 3).

Как видно на хроматограмме, концентрация меди в низкомолекулярной области (около 10 кДа) лишь немного превышает фоновое значение. Ранее было

показано, что белок МТ обнаруживается в сыворотке крови взрослых млекопитающих, вне клетки он выполняет функцию транспортера металлов, участвует в перераспределении тяжелых металлов в организме (*Lynes et al., 2006*). В рамках настоящего исследования показано присутствие МТ в сыворотке крови крыс (Рис. 3.36 А). Кроме того, была проведена оценка количества меди, связанной с МТ в сыворотке крови крыс. Для этого фракцию МТ иммунопреципитировали из сыворотки специфическими антителами. Оказалось, что около 1% от общего количества сывороточной меди новорожденных связано с белком МТ, но после переключения на ВТТМ эта величина снижается в 2 раза (Рис. 3.36 Б). Вероятно, основная часть меди в кровотоке новорожденных крыс связана с ЦП. Это предположение подтверждается опубликованными ранее данными, показавшими, что молекула ЦП новорожденных детей и телят включает больше атомов меди, чем молекула ЦП взрослого; эти “добавочные” атомы меди легко теряют связь с молекулой ЦП при обработке хелатирующим агентом Хелекс-100 (*Okumura et al., 1998; Жигулева и др., 1999*).

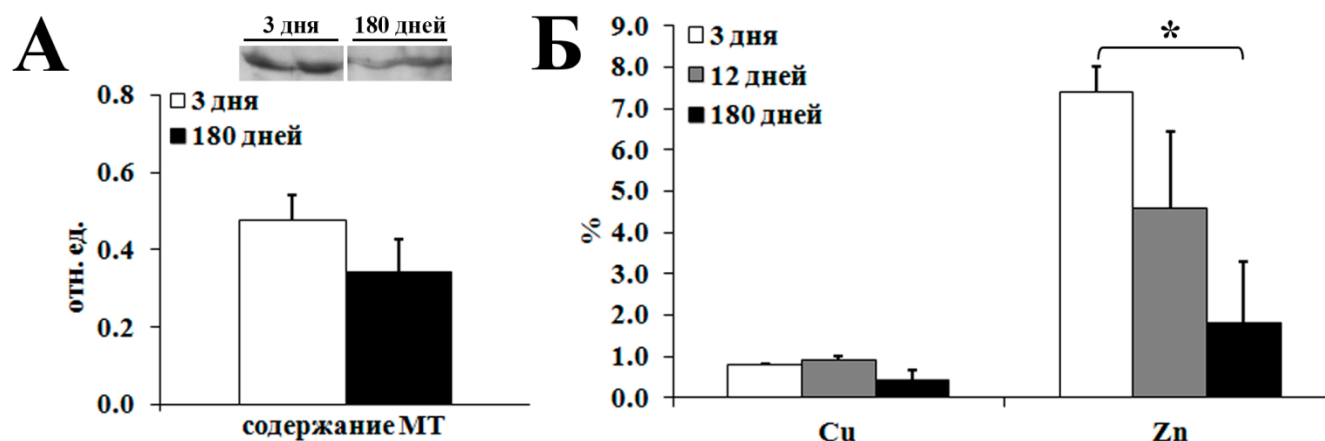


Рис. 3.36. Содержание полипептидов МТ (А) и концентрация меди и цинка во фракции МТ (Б) в сыворотке крови новорожденных и взрослых крыс.

А – содержание полипептидов МТ было определено методом иммуноблоттинга ($n = 4$). Б – концентрация металлов была определена во фракциях, иммунопреципитированных из сыворотки крови антителами к белку МТ ($n = 2$). По оси ординат отложен процент от общей концентрации металла в сыворотке крови.

* $p < 0.05$.

Помимо меди, МТ связывает атомы цинка, поэтому в иммунопреципитатах также была измерена концентрация цинка. Было показано, что у новорожденных крыс с МТ связано почти 8% общего количества цинка, в то время как у взрослых крыс этот показатель снижается в 4 раза (Рис. 3.36 Б). Общая концентрация цинка в сыворотке крови крыс снижается в 2 раза при переходе к ВТММ (Рис. 3.37).

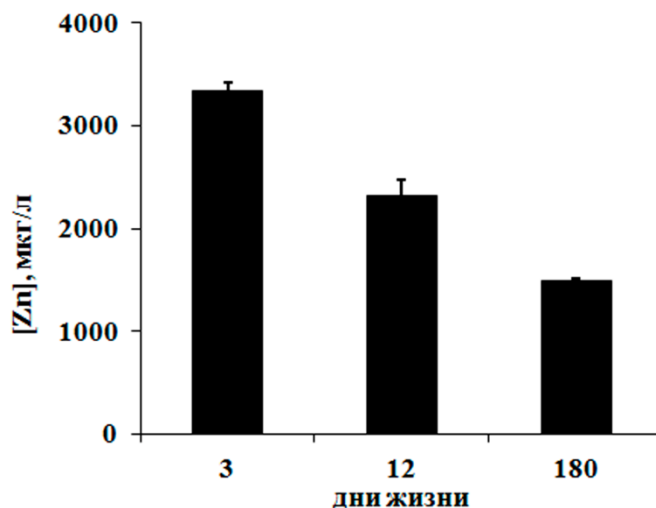


Рис. 3.37. Концентрация цинка в сыворотке новорожденных и взрослых крыс (n = 3).

Снижение содержания цинка в сыворотке крови крыс в течение онтогенеза ранее в литературе описано не было, однако эти результаты согласуются с данными, показывающими, что концентрация цинка в сыворотке крови человека уменьшается вдвое к 8-ой неделе жизни (Airede, 1997).

3.2.3. Изменение профилей экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом меди, в течение онтогенеза

Анализ экспрессии генов, кодирующих белки МСМ, проводили методом полуколичественной ОТ-ПЦР. Для данного исследования были сформированы следующие группы крыс: 3-дневные крысы, характеризующиеся ранним постнатальным периодом ЭТММ (медь накапливается в ядрах), 12-дневные крысы, поздний срок ЭТММ (медь аккумулируется в митохондриях), и взрослые 60-дневные крысы, в печени которых метаболизм меди соответствует взрослому

типу. В рамках данной работы была проведена оценка уровня экспрессии генов, кодирующих основные белки, ассоциированные с метаболизмом меди. Их список и краткая характеристика приведены выше.

Экспрессия генов, кодирующих белки МСМ, в печени крыс на разных этапах онтогенеза

Результаты ОТ-ПЦР анализа, показывающие изменение профилей активностей генов, ассоциированных с метаболизмом меди, в печени крыс на разных этапах онтогенетического развития, представлены на рисунке 3.38. Как видно из приведенных данных, в течение онтогенеза в печени крыс происходит увеличение экспрессии гена *Sr*. В печени 3-дневных крыс обнаруживается лишь следовое количество мРНК, кодирующей заякоренную в мембране сплайс-изоформу ГФИ-ЦП, однако к 12-му дню жизни содержание данной мРНК начинает увеличиваться. Ранее было показано, что мРНК, кодирующая ГФИ-ЦП, не экспрессируется в культивируемых гепатоцитах линии HepG2 (Клотченко и др., 2008). Возможно, данная мРНК синтезируется в печени клетками негепатоцитарного ряда (например, Купферовскими клетками), и доля этих клеток в печени увеличивается в течение развития.

У взрослых крыс активность гена *Ccs* многократно превосходит активность этого гена в клетках 3-дневных крыс (Рис. 3.38 Б). Повышение активности начинается еще в период ЭТММ (Рис. 3.38 А). Увеличение экспрессии генов *Sod1*, *Sod2* и *Cox4i1* также начинается до 12-го дня жизни (Рис. 3.38 А) и продолжается после смены ЭТММ (Рис. 3.38 Б).

В печени взрослых крыс увеличивается содержание СТР2-мРНК, а также многократно повышается содержание СТР1-мРНК, причем изменения начинаются уже после переключения на ВТММ (Рис. 3.38 Б). Также, экспрессия гена *Mt1a* снижается почти вдвое после 12-го дня жизни.

Из двух генов, кодирующих медь-транспортные АТФазы, в печени новорожденных крыс активно экспрессируется *Atp7a* (Рис. 3.38 А). После переключения на ВТММ экспрессия гена *Atp7a* подавляется, и его

транскрипционный продукт больше не обнаруживается в печени взрослых крыс. В то же время, экспрессия гена *Atp7b* возрастает (Рис. 3.38 Б).

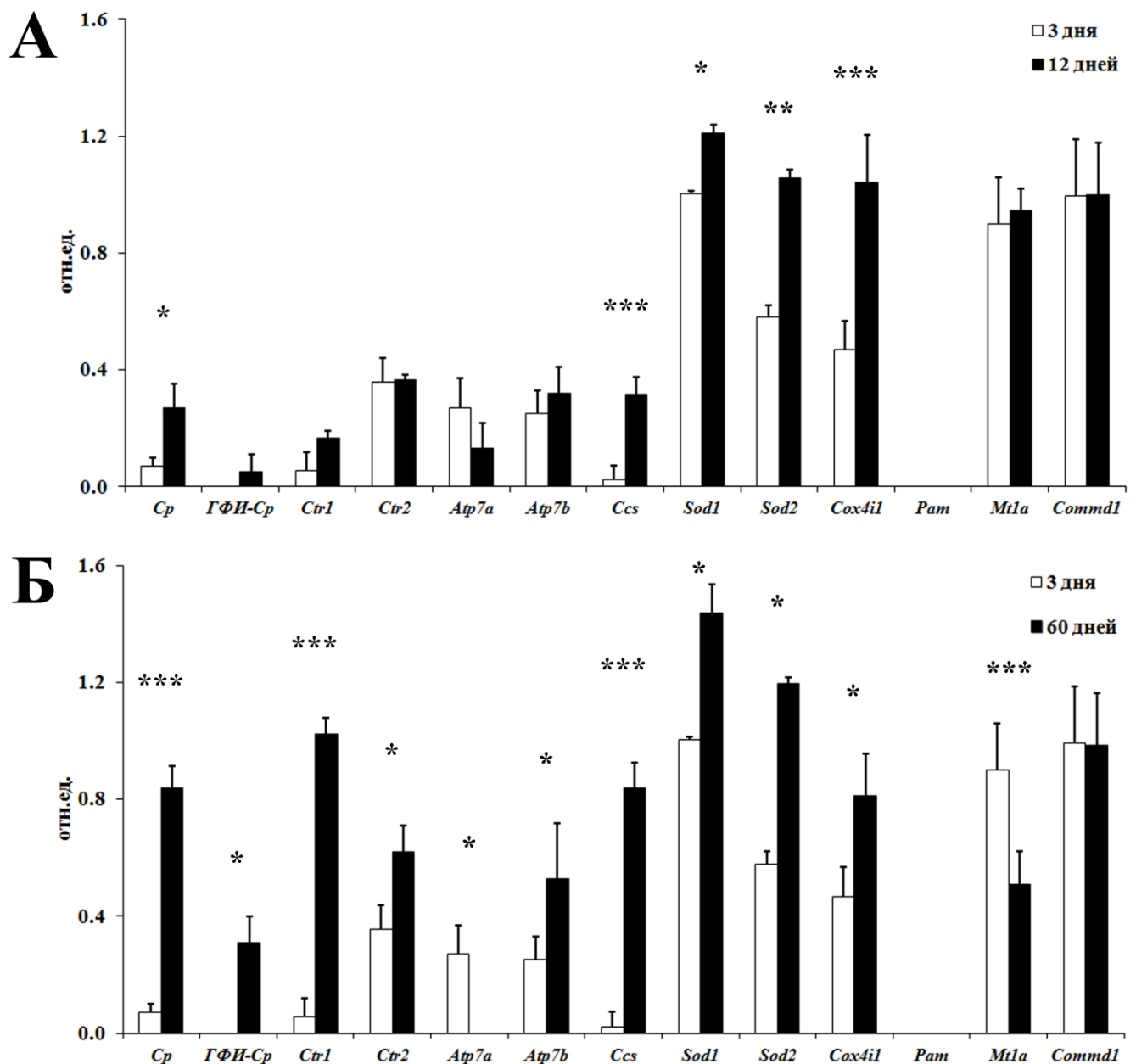


Рис. 3.38. Экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом меди, в печени крыс на разных этапах онтогенеза (n = 3).

А – профили экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом меди, в печени 3- и 12-дневных крыс, характеризующихся ЭТММ. Б – сравнение профилей экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом меди, в печени 3-дневных (ЭТММ) и 60-дневных (ВТММ) крыс. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

Низкая активность гена *Atp7b* согласуется с полученными в настоящем исследовании данными о содержании меди в сыворотке и печени новорожденных

крыс, а также с результатами, описанными в литературе. Ранее было показано, что у новорожденных детей наблюдается физиологическая недостаточность меди в сыворотке крови в сочетании с высокой ее концентрацией в печени (*Bruckmann and Zondek, 1939; Srai et al., 1986*). Схожая картина распределения меди, предшествующая появлению цирроза и признаков нейродегенерации, была описана для пациентов с болезнью Вильсона (*Srai et al., 1986; Lutsenko et al., 2007*). Данное состояние развивается в результате низкой активности гена *Atp7b*, что характерно для новорожденных при ЭТТМ, либо в случае наличия мутации в данном гене, как у пациентов с болезнью Вильсона (*Huster et al., 2006*). У новорожденных детей, а также у пациентов с прогрессирующей болезнью Вильсона методом электронной микроскопии медь была обнаружена в лизосомах (*Goldfischer and Sternlieb, 1968; Goldfischer et al., 1980*). Однако результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что накопление меди в первые дни после рождения начинается в ядре, после чего основной пул меди перемещается в митохондрии, в то время как небольшие порции меди локализуются в цитозоле и фракции внутриклеточных мембран (Рис. 3.30). Возникшее противоречие может быть объяснено использованием различных экспериментальных подходов. Так, в настоящем исследовании было проведено разделение митохондриальной и лизосомальной фракций, после чего концентрация меди была измерена при помощи ААС, в то время как при использовании электронной микроскопии определение содержания меди проводилось путем специфического окрашивания срезов печени. Данные настоящего исследования согласуются с результатами недавно опубликованных работ, в которых рассматривается распределение меди в печени нокаутных мышей *Atp7b*^{-/-} и крыс линии LEC (имеющих мутацию в гене *Atp7b*). Было показано, что накопление меди в печени этих животных начинается в ядре и продолжается в митохондриях (*Huster et al., 2006; Zischka et al., 2011*).

В данном исследовании, помимо хорошо известных изменений экспрессии генов *Cp*, *Atp7a* и *Atp7b* в печени при переключении ЭТТМ на ВТТМ (*Hurley et al., 1980; Bingle et al., 1991; Lutsenko et al., 2007*), были также впервые показаны

изменения активности генов *Ctrl*, *Ctrl2*, *Ccs* и *Mt* (Рис. 3.38). Так, экспрессия гена *Ctrl* в печени 3-дневных и 12-дневных крыс происходит на низком уровне, почти в 5 раз ниже, чем активность гена *Ctrl2*. Количество мРНК, кодирующей белок CTR1, у взрослых крыс почти в 10 раз больше, чем у новорожденных крыс. И, несмотря на то, что активность гена *Ctrl2* возрастает после смены типа метаболизма меди, значение отношения CTR1-мРНК/CTR2-мРНК увеличивается значительно.

Соответствия между экспрессией генов *Sod1* и *Ccs* в печени 3-дневных крыс обнаружено не было: при активной экспрессии гена *Sod1*, относительное содержание CCS-мРНК остается очень низким. К 12-дневному возрасту у крыс начинается повышение активности гена *Sod1*, у взрослых крыс содержание СОД1-мРНК приблизительно на 30%, чем у 3-дневных. В то же время, экспрессия гена *Ccs* возрастает почти в 10 раз. Активность гена *Sod2* повышается в течение онтогенеза (Рис. 3.38).

Было показано, что в печени крыс в течение ЭТММ экспрессия гена *Mt1a* сохраняется на довольно высоком уровне, но после переключения на ВТММ происходит двукратное снижение активности данного гена (Рис. 3.38). В то же время, экспрессия гена *Commd1* в течение онтогенетического развития не изменяется. Содержание СОХ4i1-мРНК увеличивается при смене типа метаболизма меди. Как и ожидалось, в печени крыс не происходило экспрессии гена *Ram*. Представленные результаты также показывают, что перераспределение меди из ядер в митохондрии не связано с изменением активности исследованных генов.

Экспрессия генов, кодирующих белки МСМ, в надпочечниках крыс на разных этапах онтогенеза

В отличие от печени, в клетках надпочечников крыс в течение всего онтогенеза не обнаруживаются мРНК секреторного ЦП и АТР7В (Рис. 3.39). В то же время, мРНК изоформы ГФИ-ЦП и АТР7А присутствуют от рождения и у взрослых крыс их содержание увеличивается.

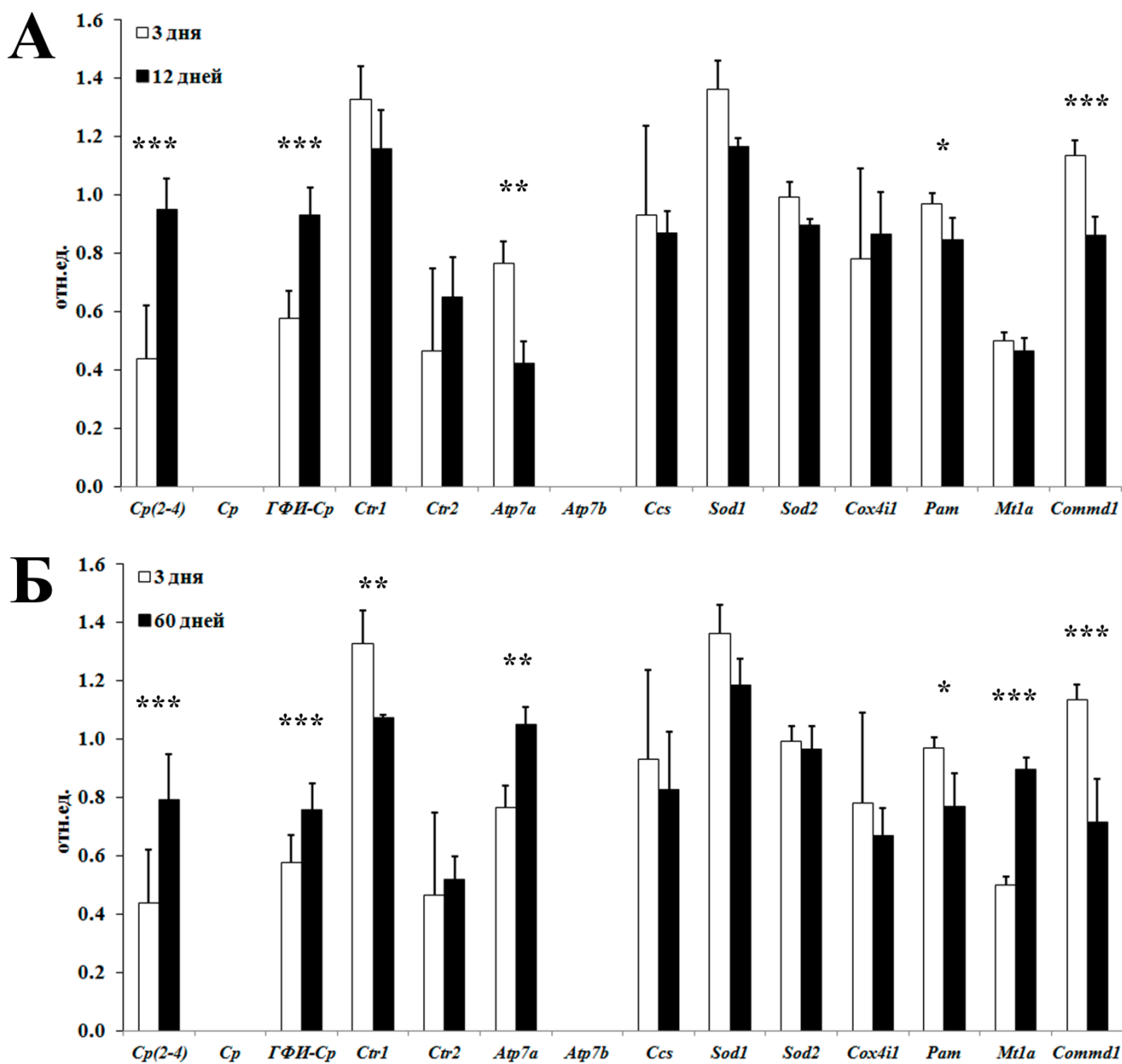


Рис. 3.39. Экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом меди, в надпочечниках крыс на разных этапах онтогенеза (n = 3).

А – профили экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом меди, в надпочечниках 3- и 12-дневных крыс, характеризующихся ЭТММ. Б – сравнение профилей экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом меди, в надпочечниках 3-дневных (ЭТММ) и 60-дневных (ВТММ) крыс. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

Для того чтобы убедиться в отсутствии мРНК секреторного ЦП, использовали пару праймеров Cp(2-4), при помощи которой обнаруживаются обе изоформы ЦП. Как видно из представленных данных, содержание ЦП-мРНК совпадает по результатам анализа с использованием праймеров ГФИ-Ср либо

Ср(2-4). Полученный результат позволяет считать, что секреторный ЦП не образуется в надпочечниках.

В надпочечниках активность гена *Ctrl* выше у новорожденных крыс, она начинает снижаться перед сменой типа метаболизма меди и у взрослых крыс почти на 20% ниже, чем у 3-дневных. Ген *Ctrl2* экспрессируется на постоянном уровне и этот уровень примерно в 2 раза ниже, чем активность гена *Ctrl*.

В надпочечниках гены *Sod1* и *Ccs* экспрессируются на близком уровне и их активность не меняется в течение онтогенеза (Рис. 3.39). Ген *Sod2* экспрессируется в надпочечниках на постоянном уровне.

В надпочечниках взрослых крыс ген *Mt1a* активнее, чем у 3-дневных и 12-дневных крыс. Количество мРНК, кодирующей белок COMMD1, снижается уже к моменту переключения на ВТТМ. Активность гена *Cox4i1* не меняется с возрастом. В отличие от печени, в надпочечниках наблюдалась активная экспрессия гена *Ram*, которая уменьшается у взрослых крыс.

Экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом железа, в печени и надпочечниках крыс на разных этапах онтогенеза

В печени и надпочечниках крыс указанных возрастных групп были также определены профили экспрессии генов, кодирующих белки, ассоциированные с обменом железа. Результаты ОТ-ПЦР анализа представлены на рисунках 3.40 и 3.41. Они показывают, что гены *Fth1* и *Ftl*, кодирующие тяжелую и легкую цепи ферритина, а также ген *Tfrc*, кодирующий рецептор трансферрина, экспрессируются более активно в печени взрослых крыс, в то время как экспрессия гена трансферрина не зависит от возраста (Рис. 3.40). У новорожденных крыс прослеживается связь между транспортом железа в печени и низким уровнем ЦП в сыворотке крови, осуществляющим окисление Fe(II) в Fe(III), необходимое для формирования холо-трансферрина. Она, возможно, состоит в повышении уровня мРНК рецептора трансферрина (Рис. 3.40).

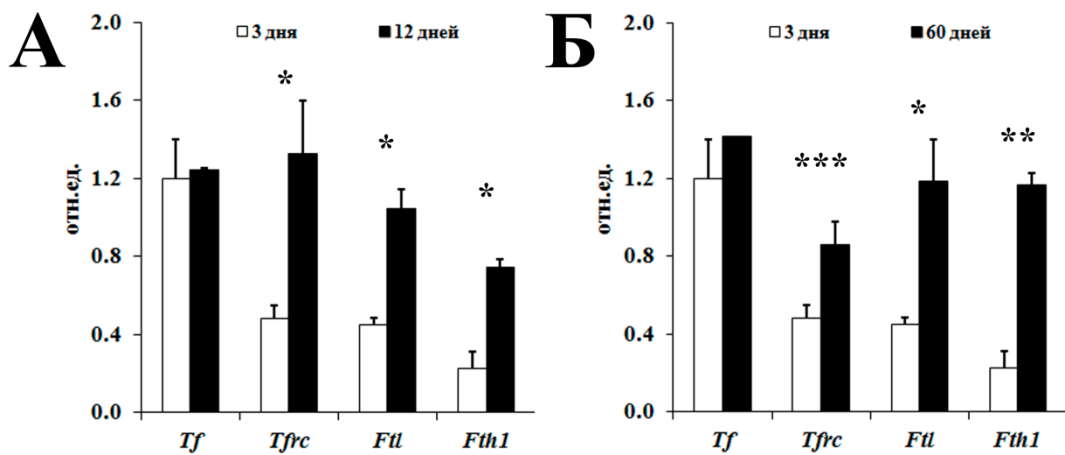


Рис. 3.40. Экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом железа, в печени крыс в течение онтогенеза (n = 3).

А – профили экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом железа, в печени 3- и 12-дневных крыс, характеризующихся ЭТММ. Б – сравнение профилей экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом железа, в печени 3-дневных (ЭТММ) и 60-дневных (ВТММ) крыс. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

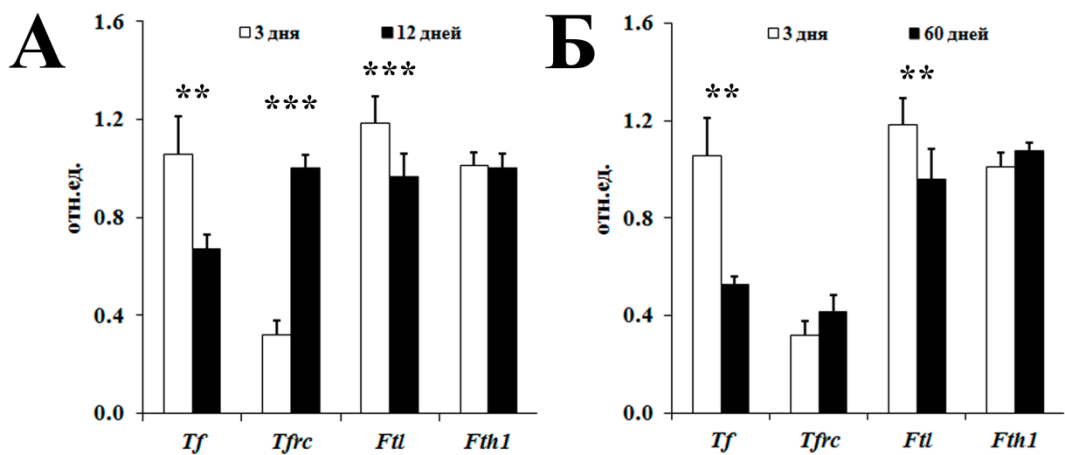


Рис. 3.41. Экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом железа, в надпочечниках крыс в течение онтогенеза (n = 3).

А – профили экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом железа, в надпочечниках 3- и 12-дневных крыс, характеризующихся ЭТММ. Б – сравнение профилей экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом железа, в надпочечниках 3-дневных (ЭТММ) и 60-дневных (ВТММ) крыс. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

В надпочечниках онтогенез-зависимый характер экспрессии проявляют гены, кодирующие легкую цепь ферритина и трансферрин (возможно, изоформа ГФИ-трансферрин). Экспрессия гена рецептора трансферрина увеличивается в надпочечниках 12-дневных крыс, но возвращается на прежний уровень у взрослых животных.

3.2.4. Содержание белков, участвующих в метаболизме меди, в печени и надпочечниках крыс в течение раннего онтогенеза

Содержание полипептидов белков, ассоциированных с метаболизмом меди, оценивали по результатам иммуноблотинга со специфическими антителами. Субклеточные фракции цитозоля и митохондрий получали из гомогенатов печени или надпочечников крыс методом дифференциального центрифугирования. При помощи специфических антител митохондриальный белок COX4, а также цитозольные белки MT, COMMD1 и СОД1 были выявлены в соответствующих субклеточных фракциях. Относительное содержание белков во фракциях определяли денситометрически (Рис. 3.42).

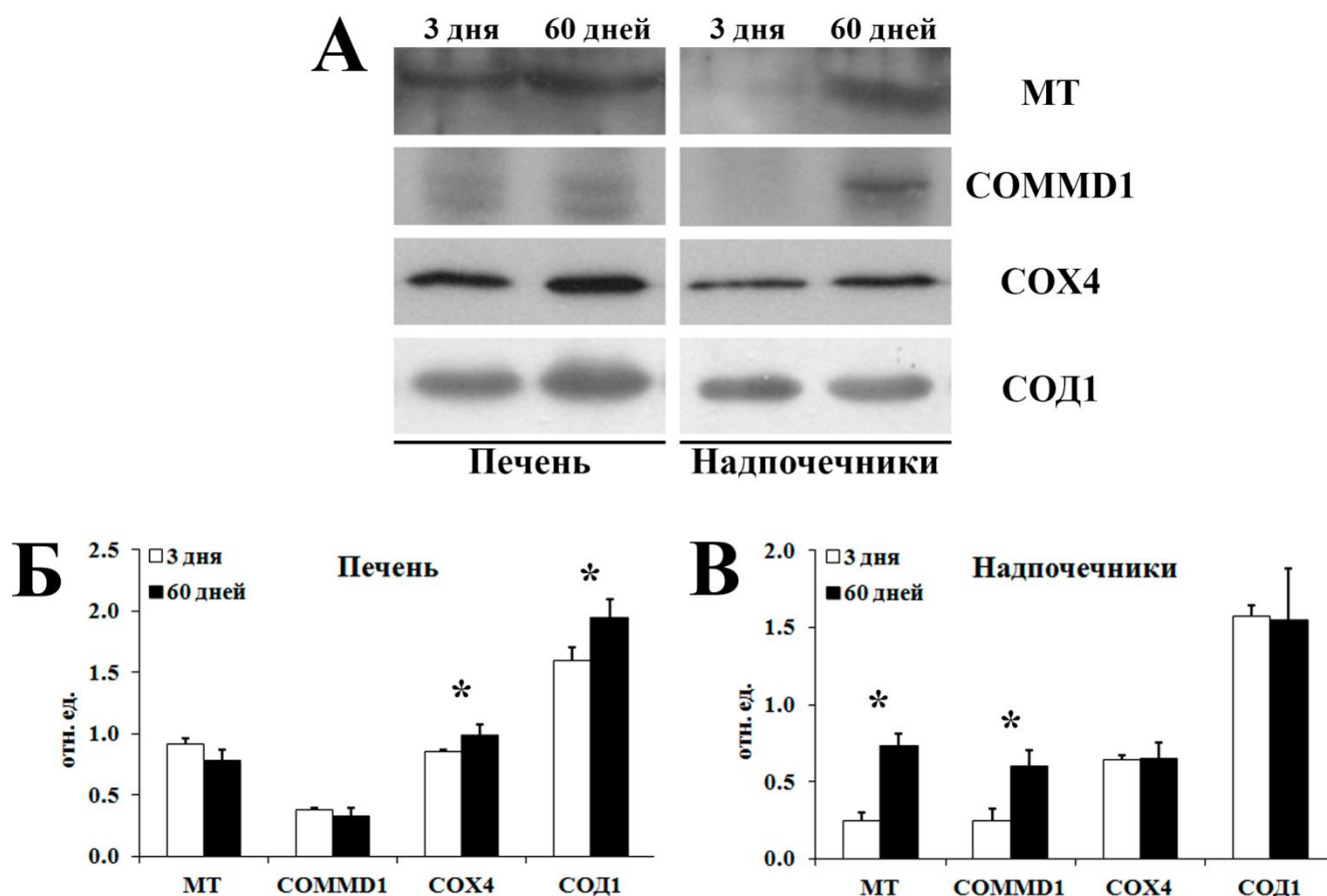


Рис. 3.42. Содержание белков, связанных с метаболизмом меди, в надпочечниках и печени крыс в течение онтогенеза (n = 3).

А – иммуноблотинг фракций цитозоля и митохондрий с антителами к MT, COMMD1, COX4 и СОД1. **Б** и **В** – денситометрический анализ данных иммуноблотинга во фракциях, выделенных из печени (**Б**) и надпочечников (**В**) крыс.

* $p < 0.05$.

Видно, что относительная концентрация полипептидов МТ и COMMD1 в надпочечниках выше у взрослых крыс. В печени содержание этих белков не меняется в течение онтогенетического развития. По результатам анализа была отмечена частичная корреляция между содержанием зрелых полипептидов МТ и COMMD1 и уровнем их мРНК. Так, в надпочечниках содержание полипептидов МТ увеличивается в течение развития, как и концентрация МТ-мРНК. В то же время, увеличение концентрации полипептидов COMMD1 происходит, несмотря на снижение активности гена, кодирующего данный белок.

В печени уровни концентрации МТ и COMMD1 не изменяются при переключении типа метаболизма меди, хотя содержание МТ-мРНК у взрослых животных снижается почти в 2 раза по сравнению с новорожденными крысами. Стоит отметить, что рассогласование между транскриптомом и протеомом характерно для многофункциональных белков, имеющих сложную систему регуляции экспрессии на уровне транскрипции и/или трансляции. Оба белка МТ и COMMD1 являются многофункциональными (*de Bie et al., 2005; Vasak and Meloni, 2011*).

Содержание белков СОХ4 и СОД1 не изменяется в надпочечниках крыс, в то время как в печени смена типов метаболизма меди сопровождается увеличением концентрации полипептидов этих белков.

Помимо определения содержания зрелых полипептидов белка СОД1, в цитозоле печени и надпочечников оценивали также уровень его ферментативной активности (Рис. 3.43).

Как показывают результаты ОТ-ПЦР анализа, иммуноблотинга и ферментативного теста (Рис. 3.38; 3.42; 3.43), содержание мРНК, кодирующей СОД1, ее трансляционного продукта, а также активной формы фермента холо-СОД1 полностью соответствуют друг другу, а также согласуются с данными литературы, показывающими увеличение экспрессии СОД1 в клетках печени в течение развития (*de Haan et al., 1994*).

Выше отмечено, что мРНК, кодирующая белок CCS, обнаруживается в печени новорожденных крыс в следовых количествах (Рис. 3.38). Недавно было

показано, что для металлирования СОД1 необходимо, чтобы комплекс CCS/СОД1 был связан с липидным бислоем, кроме того, CCS должен взаимодействовать с белком CTR1 (Pope et al., 2013). Возможно, в течение ЭТТМ металлирование апо-СОД1 осуществляется при помощи иного механизма, не зависящего от CCS, и доставку меди к СОД1 осуществляет глутатион, получивший медь от белка МТ (Carroll et al., 2004).

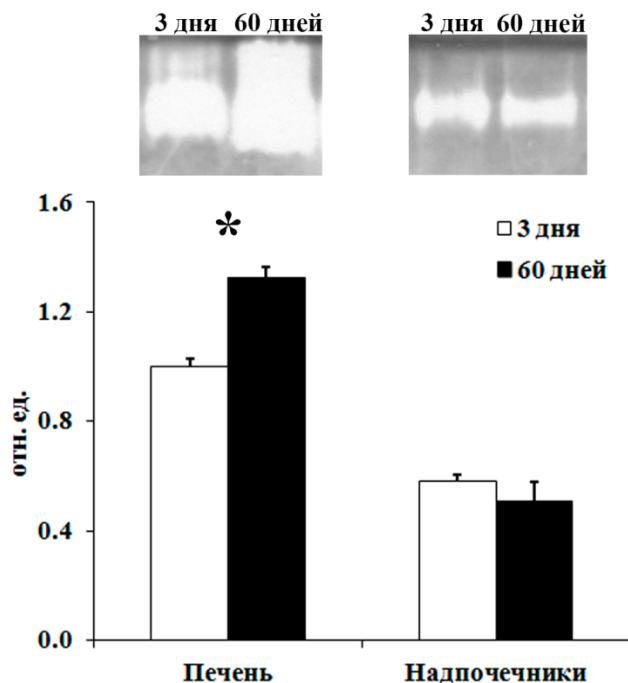


Рис. 3.43. Ферментативная активность СОД1 в печени и надпочечниках новорожденных и взрослых крыс (n = 3).

Сверху: ПААГ, окрашивание нитротетразолием синим, выявляющее ферментативную активность СОД1.

* $p < 0.05$.

Данное предположение подтверждается тем, что в период ЭТТМ в печени крыс обнаруживается высокое содержание МТ1а-мРНК, кодирующей специфическую изоформу белка МТ, вовлеченную в гомеостаз меди. В печени взрослых крыс происходит снижение активности гена *Mt1a*, в то время как экспрессия *Ccs* резко возрастает. Это означает, что после переключения на ВТТМ апо-СОД1 начинает получать медь от Cu(I)-CCS.

3.2.5. Схемы метаболизма меди в гепатоцитах в надпочечниках крыс

Данные о низком уровне экспрессии гена *Ctrl* в печени новорожденных крыс на фоне аккумуляции меди (Рис. 3.38), хорошо согласуются с результатами недавнего исследования, *in vitro* показавшего, что общий транскрипционный фактор Sp1 является медь-управляемым модулятором экспрессии гена *Ctrl*, а активность самого гена *Sp1* подавляется высоким уровнем внутриклеточной меди (Liang *et al.*, 2012). Ранее в нашей лаборатории было показано, что содержание белка Sp1 в ядре находится на очень низком уровне в печени новорожденных, но не взрослых крыс (Рис. 3.44) (Гюлиханданова и др., 2004).

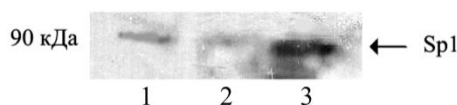


Рис. 3.44. Содержание транскрипционного фактора Sp1 в нуклеоплазме лактирующей молочной железы (1), в печени 10-дневных (2) и взрослых крыс (3). Присутствие Sp1 регистрировали методом иммуноблоттинга с моноклональными антителами к Sp1 в экстрактах ядер, изолированных методом равновесного центрифугирования. В лунку помещали по 50 мкг белка экстракта (Гюлиханданова и др., 2004).

Вероятно, *CTR1* не играет важной роли в импорте меди в гепатоциты новорожденных, поскольку основным источником пищевой меди на этом этапе является ЦП молока, синтезируемый в клетках молочной железы крысы-матери и секретируемый в молоко (Пучкова и др., 1994; Cerveza *et al.*, 2000). Основная часть меди в снятом молоке находится в составе ЦП (Platonova *et al.*, 2007). Он переносится из пищеварительного тракта в кровотока новорожденных путем трансцитоза с участием рецептора ЦП (Platonova *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2012). После этого клетки печени эндоцитируют молочный ЦП также при помощи специфического рецептора. Ген рецептора церулоплазмينا экспрессируется в гепатоцитах и клетках слизистой оболочки кишечника только у новорожденных животных. Активность этого гена подавлена у взрослых (Kataoka and Tavassoli, 1984; Crowe and Morgan, 1996; Платонова и др., 2004; Платонова и др., 2005;

Platonova, et al., 2007). Следует отметить, что ЦП молока как источник пищевой меди адаптирован к ЭТММ. Его молекула содержит больше атомов меди, чем холо-ЦП сыворотки крови (*Пучкова и др., 1997*), а по сравнению с солями меди или комплексом меди с гистидином, лучше усваивается органами эмбриона крысы (*Lee, et al., 1993*). Представленные данные позволяют рассматривать ЦП молока как физиологический источник меди для новорожденных, а рецептор ЦП и ЦП молока – партнерами в транспорте меди в организме новорожденного.

Таким образом, путем эндоцитоза нагруженного медью молочного ЦП в печени новорожденных пищевая медь попадает в лизосомы, где при низких значениях pH медь выходит из состава молекулы ЦП и при помощи Fe/Cu-редуктазы STEAP4 восстанавливается до состояния окисления Cu(I) (*Knutson, 2007*). Далее медь взаимодействует с медь-связывающими мотивами белка CTR2, который принимает участие в лизосомальном обороте меди (*Rees et al., 2004*) и переносит медь из лизосомы в цитозоль, где медь распределяется в соответствии с потребностями в ней клетки. Модель предположительного пути обмена меди, включающего участие CTR2, объясняет существующую диспропорцию между уровнями экспрессии генов *Ctrl* и *Ctr2* в клетках печени новорожденных крыс (Рис. 3.45).

Возможно, что в печени взрослых млекопитающих CTR2 участвует в рециклизации меди, связанной с асиаловым ЦП, который из кровотока утилизируется рецептором асиалогликопротеинов (*Gregoriadis et al., 1970*). В то же время, основной путь импорта меди в клетки печени взрослых крыс осуществляется через белок CTR1, что согласуется с резким повышением уровня экспрессии гена *Ctrl* после снижения содержания меди в печени и активации гена *Sp1*. В отличие от гепатоцитов новорожденных крыс, в печени взрослых животных доставку меди к цитозольному купроэнзиму СОД1 осуществляет шаперон CCS, экспрессия гена *Ccs* резко возрастает при переходе на ВТММ. Схематическое представление обмена меди в гепатоцитах взрослых крыс дано на рисунке 3.46.

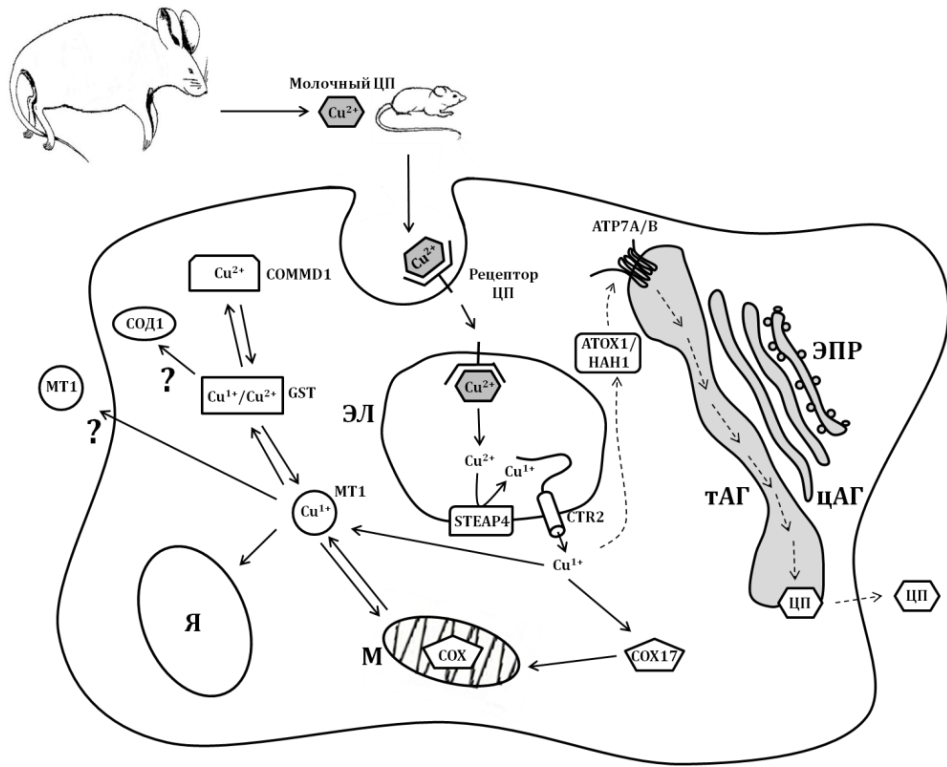


Рис. 3.45. Схема метаболизма меди в гепатоцитах новорожденных крыс.

Я – ядро, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, цАГ – цис-сеть аппарата Гольджи, тАГ – транс-сеть аппарата Гольджи, ЭЛ – эндолизосома.

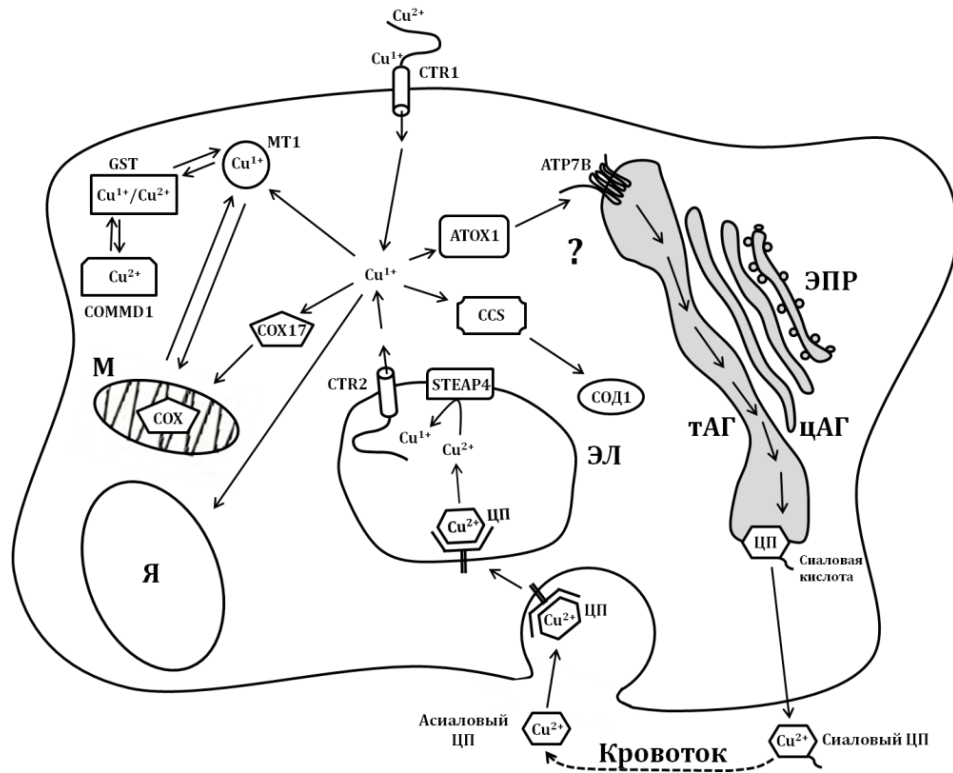


Рис. 3.46. Схема метаболизма меди в гепатоцитах взрослых крыс.

Я – ядро, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, цАГ – цис-сеть аппарата Гольджи, тАГ – транс-сеть аппарата Гольджи, ЭЛ – эндолизосома.

В надпочечниках система метаболизма меди имеет много схожего с клетками негепатоцитарных рядов. Так, в клетках надпочечников из двух Cu(I)-АТФаз экспрессируется только ген *Atp7a*. Это характерно для большинства клеток всех органов новорожденных и взрослых млекопитающих за исключением гепатоцитов и клеток некоторых отделов мозга (Платонова и др., 2005; Клотченко и др., 2008). Известно, что АТР7А принимает участие в металлировании купроэнзимов, формирующихся в аппарате Гольджи (Polishchuk and Lutsenko, 2013). В настоящем исследовании были оценены уровни экспрессии генов *Cp* и *Pam*, кодирующих купроэнзимы, формирующиеся в секреторном пути. Ген *Cp* активен в надпочечниках, но формируется только сплайс-форма мРНК, кодирующая белок ГФИ-ЦП. Активность гена *Cp* растет в течение развития. Ген, кодирующий белок РАМ, экспрессируется активно, но уровень РАМ-мРНК снижается на 30% в течение развития. Возможно, последнее происходит вследствие созревания гипоталамо–гипофизарно–надпочечниковой системы и уменьшения продукции нейропептидов клетками надпочечников. Молекула ГФИ-ЦП содержит 6 – 8 атомов меди, в то время как молекула РАМ содержит только 2 атома, поэтому можно сказать, что усиление экспрессии гена *Atp7a* согласуется с повышением потребности в меди. Возможно, медь, ассоциированная с ГФИ-ЦП и РАМ, может быть рециклирована путем эндоцитоза или макроаутофагии через лизосомальную систему STEAP4/CTR2 (Рис. 3.47).

Присутствие МТ в сыворотке новорожденных крыс описано впервые (Рис. 3.36). Этот белок был нагружен медью и цинком, но связывание с микроэлементами могло происходить только внутри клеток, иначе апо-МТ был бы немедленно окислен во внеклеточном пространстве. Происхождение МТ, механизм доставки этого типичного белка цитозоля в кровотока, а также его физиологическая роль требуют дальнейшего исследования. Можно предположить, что у новорожденных МТ печени может играть роль межорганного переносчика микроэлементов и служить донором меди для клеток надпочечников, а после переключения с ЭТТМ на ВТТМ данная функция МТ

теряется и наблюдается снижение уровня мРНК данного белка в печени (Рис. 3.38).

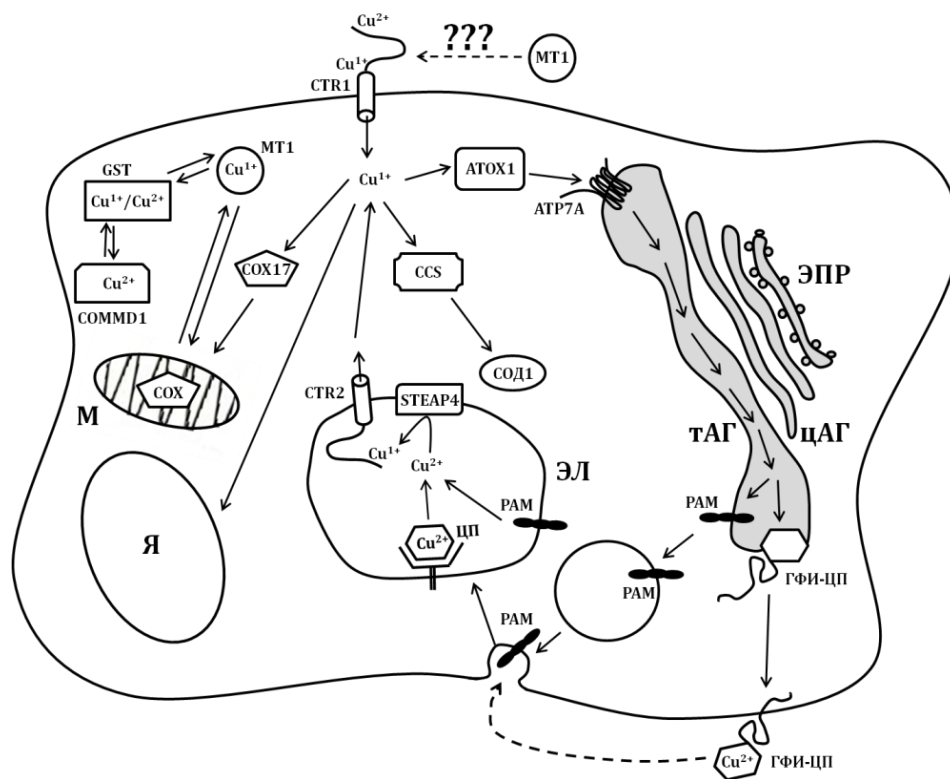


Рис. 3.47. Схема метаболизма меди в надпочечниках взрослых крыс.

Я – ядро, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, цАГ – цис-сеть аппарата Гольджи, тАГ – транс-сеть аппарата Гольджи, ЭЛ – эндолизосома.

Однако нельзя исключить, что донором меди для клеток надпочечников у новорожденных может являться сывороточный ЦП, в составе которого находятся лабильные атомы меди. Для того чтобы понять роль МТ в поддержании межорганного баланса меди, а также идентифицировать донора меди для клеток надпочечников, необходимы дополнительные исследования.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование состоит из двух частей. В первой части изучено влияние АЭ на метаболизм меди в печени крыс. Во второй части сопоставлены изменения метаболизма меди в печени и надпочечниках в течение онтогенеза.

Печень млекопитающих секретирует в кровотоки ЦП, являющийся одновременно медь-транспортным белком, обеспечивающим медью клетки негепатоцитарных рядов, и купроэнзимом. Известно, что в комплексе с ЦП находится до 95% от общего количества меди в сыворотке крови крыс (*Prohaska, 2011*). В работе было показано, что удаление надпочечников приводит к существенному изменению показателей статуса меди в сыворотке крыс. Согласованное повышение содержания полипептидов ЦП, уровня его (ферр)оксидазной активности, а также концентрации сывороточной меди свидетельствует о том, что АЭ стимулирует секрецию холо-ЦП. Однако, как показывают данные ОТ-ПЦР, АЭ не активирует экспрессию его гена. Кроме того, в сыворотке крови АЭ крыс было показано присутствие белка МТ, причем у АЭ содержание сывороточного МТ увеличивается. МТ является белком цитозоля, и лишь недавно было показано существование его во внеклеточном пространстве (*Lynes et al., 2006*).

В работе было показано, что АЭ приводит к повышению концентрации меди в органах, для которых характерен интенсивный метаболизм меди – печень, корковый слой почек, гипоталамус. В то же время, в мозговом слое почек, где обмен меди происходит на невысоком уровне, содержание меди не изменяется. Возможно, это связано со сроком (в работе исследования проводили на 10 день после АЭ), на котором действует АЭ. Нельзя исключить, что при более длительном воздействии изменения метаболизма меди будут наступать и в других органах. Полученное в настоящем исследовании увеличение концентрации меди в печени АЭ крыс полностью согласуются с немногочисленными данными литературы (*Gregoriadis and Sourkes, 1970; Prohaska et al., 1988; Fields et al., 1991*). Для гепатоцитов АЭ крыс характерно внутриклеточное перераспределение

меди. Так, в цитозоле клеток содержание меди увеличивается, а во фракции митохондрий падает.

Исследование показало, что некоторая часть меди, определенной в цитозоле, связана с сывороточным ЦП и, по-видимому, появляется в цитозольной фракции как результат загрязнения фракции компонентами крови. Содержание полипептидов основного купроэнзима цитозоля СОД1 не изменяется после АЭ, но снижение ферментативной активности данного белка свидетельствует, что происходит снижение отношения холо-СОД1/апо-СОД1. Вероятно, изменение уровня металлирования СОД1 связано с тем, что осуществляющий данный процесс шаперон CCS получает медь в межмембранном пространстве митохондрий (*Leary et al., 2009*), и снижение концентрации меди в этих органеллах приводит к снижению металлирования СОД1. В то же время, увеличивается нагрузка медью белка МТ, выполняющего в цитозоле функцию клеточного депо меди (*Palacios et al., 2011; Sutherland and Stillman, 2011*), хотя содержание полипептидов данного белка остается на прежнем уровне. Стоит также отметить, что в низкомолекулярной фракции цитозоля АЭ крыс, не содержащей белкового вещества, появляется неизвестный компонент, обладающей СОД активностью (способный окислять рибофлавин). В цитозоле ЛЮ крыс подобный компонент выявлен не был.

Характеристика протеома, проведенная в митохондриальной фракции гепатоцитов методом двумерного электрофореза, показала, что в результате АЭ происходит изменение состава протеома. Для идентификации обнаруженных изменений требуются дальнейшие исследования.

Получение и очистка митохондриальной фракции сочетанием методов дифференциального и ультрацентрифугирования показали, что популяция митохондрий в гепатоцитах гетерогенна и существующая традиционная методика не позволяет выделить полную популяцию. Так, существует субпопуляция митохондрий, седиментирующая с ядерной фракцией. Интересно, что АЭ влияет на состав митохондрий данной субпопуляции, резко снижая отношение содержания мтДНК/СОХ4. Одно из наших рабочих предположений состоит в том,

что неоднородность популяции митохондрий обусловлена различием их функций в клетке. Часть митохондрий участвует в интенсивном клеточном дыхании, в них в процессе работы электрон-транспортной цепи выделяются токсичные радикалы кислорода, повреждающие липиды внутренней мембраны, белки и мтДНК (*St-Pierre et al., 2002; Brand, 2010*). После накопления критического уровня нарушений митохондрии утилизируются макроаутофагией. Другая группа митохондрий, с низкой интенсивностью клеточного дыхания, что защищает их мтДНК от повреждения, производит митохондрии для интенсивного энергетического метаболизма. Основной функцией митохондрий данной группы является поддержание пула митохондрий в клетке.

По-видимому, описанные изменения обмена меди в печени АЭ крыс не являются результатом дефицита гормонов надпочечников, так как анализ промоторных областей генов МСМ не выявил цис-элементов, регулируемых гормонами надпочечников. Кроме того, АЭ не приводит к изменению профиля экспрессии генов, кодирующих медь-транспортные белки, купроэнзимы, белки, участвующие в депонировании меди, а также белки, ассоциированные с метаболизмом железа, который тесно связан с обменом меди.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что надпочечники оказывают влияние на поддержание гомеодинамики меди в клетках печени. По-видимому, надпочечники осуществляют регуляцию распределения меди по клеточным компартментам гепатоцитов и экскреции ее через желчь. Поскольку для изучения механизмов данного процесса необходимо понимать особенности метаболизма меди в самих надпочечниках, второй этап диссертационного исследования был посвящен характеристике метаболизма меди в печени и надпочечниках крыс на разных сроках онтогенетического развития.

Известно, что в течение онтогенеза распределение меди в теле млекопитающих заметно изменяется (*Mason, 1979*). В зависимости от периода развития различают два типа поддержания баланса меди, ЭТММ и ВТММ. В течение внутриутробного развития медь накапливается в печени зародыша, и ее накопление продолжается некоторое время после рождения (*Allen et al., 2006*). У

лабораторных крыс ЭТММ сохраняется до 13 дня жизни (*Walravens, 1980*), у человека – примерно до 4-месячного возраста (*Hurley et al., 1980*). В это время концентрация меди и церулоплазмينا в крови в несколько раз ниже, чем у взрослых. Медь выводится с мочой. Затем происходит резкое перераспределение меди в организме: содержание меди и церулоплазмينا в крови повышается, в то время как в печени происходит снижение концентрации меди. Медь начинает выводиться через желчь. В этих изменениях состоит переход ЭТММ на ВТММ. Эти результаты согласуются с данными, полученными в настоящем исследовании. Кроме того, проведенное в рамках данной работы изучение распределения меди между компартментами гепатоцитов показало, что накопление меди в раннем постнатальном онтогенезе начинается в ядре, но после 5-го дня жизни медь переносится в митохондрии, где продолжается до 13-го дня жизни, когда происходит падение концентрации меди в печени. В то же время, в клетках надпочечников снижение содержания меди начинается с 1-го дня жизни, а к 5-му дню концентрация меди достигает уровня, характерного для взрослых животных.

В сыворотке крови новорожденных крыс наблюдается постепенное повышение показателей статуса меди. Так, концентрация ЦП, характерная для взрослых животных, достигается только к 40-му дню жизни.

Метаболизм меди в гепатоцитах новорожденных крыс характеризуется низкой активностью генов *Cp*, *Ctr1*, *Ccs* и *Atp7b*, но в то же время достаточно активен ген *Ctr2*. Ген *Atp7a* экспрессируется только в печени новорожденных крыс, после смены типа метаболизма меди его активность подавляется. Млекопитающие в период ЭТММ получают пищевую медь от ЦП молока, который попадает в гепатоциты путем эндоцитоза (*Platonova et al., 2007*), т.е. белок CTR1 не является основным импортером меди в клетки печени. Белок CTR2 принимает участие в транспорте меди из эндолизосом в цитозоль. Металлирование СОД1 в печени взрослых крыс осуществляет белок CCS, но в печени 3-дневных крыс ген *Ccs* экспрессируется на низком уровне, что согласуется с низкой активностью гена *Ctr1*, т.к. недавно было показано, что

взаимодействие белков CCS и CTR1 является обязательным условием для осуществления металлирования СОД1 (Pope et al., 2013). Вероятно, в клетках новорожденных металлирование СОД1 происходит по другому механизму, не зависящему от CCS. Данные, показывающие адаптацию метаболизма меди в печени новорожденных крыс к ЦП молока как источнику пищевой меди, подчеркивают важность поддержания правильного баланса пищевой меди при искусственном вскармливании новорожденных, так как нет молочных смесей соответствующих грудному молоку по содержанию и упаковке меди.

Низкая активность гена *Atp7b* обуславливает физиологическую недостаточность меди в сыворотке крови в сочетании с высокой ее концентрацией в печени (Srai et al., 1986), что напоминает распределение меди в организме пациентов с болезнью Вильсона, имеющих мутацию в гене *Atp7b* (Lutsenko et al., 2007; Huster et al., 2006).

В надпочечниках крыс не происходит перестройки системы обмена меди при переходе на ВТММ. В результате экспрессии гена *Cp* продуцируется заякоренная в мембрану изоформа ГФИ-ЦП, количество мРНК данной изоформы увеличивает в течение развития. Ген *Ctr1* экспрессируется на высоком уровне, что свидетельствует о том, что импорт меди в клетки надпочечников новорожденных крыс осуществляет белок CTR1. Вероятно это показывает, что донор меди для надпочечников новорожденных крыс отличается от донора меди для гепатоцитов, однако природа этого донора на данный момент не установлена.

Можно предположить, что функцию переносчика меди выполняет внеклеточный МТ, присутствие которого в сыворотке крови новорожденных крыс было впервые показано в настоящем исследовании. Предположение поддерживается данными, показавшими, что у новорожденных крыс с МТ сыворотки связывается в 2 раза больше атомов меди и в 4 раза больше атомов цинка, чем у взрослых крыс.

В надпочечниках ген, кодирующий *Atp7a*, активен от рождения и в течение онтогенеза его активность увеличивается, в то время как экспрессии гена *Atp7b* не происходит вообще. Это характерно для большинства клеток всех органов

млекопитающих за исключением гепатоцитов и клеток некоторых отделов мозга (Платонова и др., 2005; Клотченко и др., 2008). Гены *Sod1* и *Ccs* экспрессируются на близком уровне и их активность не меняется при переключении на ВТММ. Это означает, что СОД1 получает медь преимущественно через шаперон CCS. В надпочечниках наблюдается активная экспрессия гена *Pam*, кодирующего специфический купроэнзим мозга и надпочечников, у взрослых крыс активность этого гена снижается.

Данные, полученные в этой работе, расширяют сведения о метаболизме меди в печени новорожденных в период ЭТММ (Таб. 4.1). Полученные данные позволяют считать, что в период ЭТММ в печени 1) механизм накопления меди и ее распределение в органеллах совпадают с таковыми у больных болезнью Вильсона; 2) CTR1 не является ни основным импортером меди в клетки, ни донором для CCS; поэтому металлирование СОД1 осуществляется не CCS, а $\text{Cu(I)} \leftrightarrow \text{Cu(II)}$ окислительно-восстановительной системой; 3) профиль экспрессии генов медьтранспортных белков адаптирован к основному пищевому источнику меди, ЦП молока.

Таблица 4.1. Расширенная сравнительная характеристика ЭТММ и ВТММ в печени и сыворотке крови крыс

	ЭТММ	ВТММ
1	2	3
Источник пищевой меди	ЦП молока	Низкомолекулярные лиганды Cu(II)
Концентрация меди в печени	Накапливается. Аккумуляция меди начинается в ядрах, после 5-го дня основная доля меди локализуется в митохондриях	Резко снижается после 13-го дня жизни
Концентрация меди в сыворотке крови	Низкая	Увеличивается после переключения типа метаболизма меди
Церулоплазмин	Ген <i>Cp</i> практически не активен в печени, низкое содержание секреторного ЦП в сыворотке	Активируется ген <i>Cp</i> в печени, увеличивается содержание секреторного ЦП в сыворотке
Рецептор ЦП	Синтезируется в печени и клетках слизистой оболочки кишечника	Активность гена полностью подавляется
Избыток меди	Накапливается в печени	Выводится через желчь

1	2	3
АТР7А	Ген активно экспрессируется	Активность гена полностью подавляется
АТР7В	Ген не активен	Ген активируется
СТР1	Активность гена очень низкая	Экспрессия гена резко увеличивается
СТР2	Активность гена на среднем уровне	Активность гена немного увеличивается
СОД1	Ген активно экспрессируется.	Увеличивается активность гена, повышается содержание полипептидов СОД1 и уровень ферментативной активности.
ССS	Экспрессируется на очень низком уровне, не обеспечивает металлизацию СОД1	Экспрессия гена резко возрастает, белок участвует в металлизации СОД1
МТ	Активность гена на среднем уровне	Активность гена немного снижается.

Медь-транспортная система надпочечников соответствует таковой в клетках негепатоцитарных рядов, профиль экспрессии генов медь-транспортных белков не меняется в течение развития. В раннем постнатальном развитии вероятным источником меди для клеток надпочечников является внеклеточный МТ, возможно, печеночного происхождения.

5. ВЫВОДЫ

1. Метаболизм меди в печени зависит от надпочечников: адреналэктомия повышает определяемые печенью показатели статуса меди в крови, вызывает накопление меди в гепатоцитах и перераспределение меди между цитозолем и митохондриями. Адреналэктомия влияет на металлизацию СОД1 и церулоплазмину, увеличивает удельное содержание меди в металлотioneине и изменяет протеом митохондрий. Экспрессия генов, связанных с метаболизмом меди, не контролируется гормонами надпочечников.
2. В печени новорожденных крыс в течение эмбрионального типа метаболизма меди происходит внутриклеточное перераспределение аккумулированной меди: после рождения медь накапливается в ядрах и затем перемещается в митохондрии. Перемещение меди не сопровождается изменением профиля экспрессии или активности генов метаболизма меди, взятых в рассмотрение.
3. В печени новорожденных крыс активность генов *Ctrl* и *Ccs*, участвующих в металлизации СОД1, не соответствует содержанию СОД1-мРНК, концентрации иммунореактивных полипептидов СОД1 и ее ферментативной активности. При взрослом типе метаболизма меди активности генов *Ctrl*, *Ccs* и *Sod1* соответствуют друг другу. Пути металлизации СОД1, центрального фермента антиоксидантной системы, у новорожденных и взрослых млекопитающих отличаются. У новорожденных крыс, в отличие от взрослых, ген *Ctrl2*, белковый продукт которого импортирует медь из лизосом в цитозоль, активнее гена *Ctrl*, импортера внеклеточной меди.
4. В надпочечниках нет выраженных эмбрионального и взрослого типов метаболизма меди: медь не аккумулируется у новорожденных, профиль экспрессии генов медьтранспортных белков и уровень их активности практически не меняются. Метаболизм меди в надпочечниках имеет много общего с клетками негепатоцитарных рядов: из генов двух Cu(I)-АТФаз экспрессируется только *Atp7a*, ген *Cp* активен, но синтезируется только сплайс-изоформа ГФИ-ЦП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березов ТТ, Коровкин БФ. Биологическая химия: Учебник. -М: Медицина, 1998. -704 с.
2. Гюлиханданова НЕ, Цымбаленко НВ, Платонова НА, Бабич ПС и Пучкова ЛВ. Регуляция гена церулоплазмينا у млекопитающих // БЭМБ. 2004. 137(5): 485-489.
3. Жигулева ЭА, Мокшина СВ, Пучкова ЛВ и Гайцхоки ВС. Некоторые свойства фетального церулоплазмينا человека // БЭМБ. 1999. 118(10): 453-456.
4. Клотченко СА, Цымбаленко НВ, Соловьев КВ, Скворцов АН, Затуловский ЕА, Бабич ПС, Платонова НА, Шавловский ММ, Пучкова ЛВ и Броджини М. Влияние ионов серебра на метаболизм меди и экспрессию генов медьтранспортных белков в печени крыс // ДАН. 2008. 418(4): 549-552.
5. Ленинджер А. Основы биохимии. В 3-х томах, Т.3. -М: Мир, 1985. -320 с.
6. Маниатис Т, Фрич Э и Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. -М: Мир, 1984. -480 с.
7. Неттер Ф. Атлас анатомии человека: Уч. пос. -М: ГЭОТАР-МЕД, 2003. -600 с.
8. Платонова НА, Гюлиханданова НЕ, Жигулева ЭА, Живулько ТВ, Воронина ОВ, Евсюкова ИИ, Цымбаленко НВ и Пучкова ЛВ. Роль церулоплазмينا молока как физиологического источника пищевой меди в раннем онтогенезе млекопитающих // Рос физиол журн им ИМ Сеченова. 2005. 91: 666-677.
9. Платонова НА, Жигулева ЭА, Цымбаленко НВ, Мищенко БС, Васин АВ, Живулько ТВ и Пучкова ЛВ. Возрастные особенности биосинтеза и распределения церулоплазмينا в организме крыс // Онтогенез. 2004. 35(3): 171-182.
10. Пучкова ЛВ, Алейникова ТД, Вербина ИА, Захарова ЕТ, Плисс МГ и Гайцхоки ВС. Биосинтез двух молекулярных форм церулоплазмينا в печени

- крысы и их полярная секреция в кровотоки и в желчь // Биохимия. 1993. 58(12): 1893-1900.
11. Пучкова ЛВ, Алейникова ТД, Цымбаленко НВ, Захарова ЕТ, Конопитцева ЛА, Чеботарь НА и Гайцхоки ВС. Биосинтез и секреция церулоплазмينا клетками молочной железы в период лактации // Биохимия. 1994. 59(2): 341-348.
 12. Пучкова ЛВ, Захарова ЕТ, Алейникова ТД, Мокшина СВ, Цымбаленко НВ, Сасина ЛК, Ширманова МР, Рогачева НП и Гайцхоки ВС. Сравнительный анализ молекулярной микрогетерогенности церулоплазмينا крови и грудного молока человека // Биохимия. 1997. 62(8): 1082-1085.
 13. Розен ВБ. Основы эндокринологии. -М: Изд-во МГУ, 1994. -384 с.
 14. Airede AI. Zinc levels in the Nigerian full-time newborn from birth to six months // East Afr Med J. 1997. 74(4): 221-223.
 15. Aldridge GM, Podrebarac DM, Greenough WT and Weiler JJ. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting // J Neurosci Methods. 2008. 172(2): 250-254.
 16. Allen KJ, Buck NE, Cheah DM, Gazeas S, Bhathal P and Mercer JF. Chronological changes in tissue copper, zinc and iron in the toxic milk mouse and effects of copper loading // Biometals. 2006. 19(5): 555-564.
 17. Antonini E, Brunori M, Greenwood C and Malmstrom BG. Catalytic mechanism of cytochrome oxidase // Nature. 1970. 228(5275): 936-937.
 18. Arguello JM, Eren E and Gonzalez-Guerrero M. The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases // Biometals. 2007. 20(3-4): 233-248.
 19. Armario A, Hidalgo J, Bas J, Restrepo C, Dingman A and Garvey JS. Age-dependent effects of acute and chronic intermittent stresses on serum metallothionein // Physiol Behav. 1987. 39(2): 277-279.
 20. Arnold J. Ein Beitrag zu der feineren Struktur und dem Chemismus der Nebennieren // Virchows Arch Pathol Anat Physiol. 1866. 39: 64-117 (цит по Vinson GP.

- Glomerulosa function and aldosterone synthesis in the rat // *Mol Cell Endocrinol.* 2004. 217(1-2): 59-65).
21. Babich PS, Skvortsov AN, Rusconi P, Tsymbalenko NV, Mutanen M, Puchkova LV and Brogginini M. Non-hepatic tumors change the activity of genes encoding copper trafficking proteins in the liver // *Cancer Biol Ther.* 2013. 14(7): 614-624.
 22. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB // *J Clin Invest.* 2001. 107(3): 241-246.
 23. Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, Szklarczyk R, Calvo E, Landazuri MO and Enriquez JA. NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain // *Cell Metab.* 2012. 16(3): 378-386.
 24. Bartuzi P, Hofker MH and van de Sluis B. Tuning NF-κB activity: a touch of COMMD proteins // *Biochim Biophys Acta.* 2013. 1832(12): 2315-2321.
 25. Bauerly KA, Kelleher SL and Lonnerdal B. Effects of copper supplementation on copper absorption, tissue distribution, and copper transporter expression in an infant rat model // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005. 288(5): G1007-1014.
 26. Beato M. Gene regulation by steroid hormones // *Cell.* 1989. 56(3): 335-344.
 27. Bertinato J, Swist E, Plouffe LJ, Brooks SP and L'Abbe M R. Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells // *Biochem J.* 2008. 409(3): 731-740.
 28. Biasio W, Chang T, McIntosh CJ and McDonald FJ. Identification of Murr1 as a regulator of the human delta epithelial sodium channel // *J Biol Chem.* 2004. 279(7): 5429-5434.
 29. Bingle CD, Epstein O, Srai SK and Gitlin JD. Hepatic caeruloplasmin-gene expression during development in the guinea-pig. Correlation with changes in hepatic copper metabolism // *Biochem J.* 1991. 276 (Pt 3): 771-775.
 30. Bizon A and Milnerowicz H. Participation of metallothionein and superoxide dismutase in the blood of smoking smelters // *Int J Occup Med Environ Health.* 2014. 27(2): 326-334.

31. Bleackley MR and Macgillivray RT. Transition metal homeostasis: from yeast to human disease // *Biometals*. 2011. 24(5): 785-809.
32. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem*. 1976. 72: 248-254.
33. Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production // *Exp Gerontol*. 2010. 45(7-8): 466–472.
34. Bremner I and Davies NT. The induction of metallothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake // *Biochem J*. 1975. 149(3): 733-738.
35. Bruckmann G and Zondek SG. Iron, copper and manganese in human organs at various ages // *Biochem J*. 1939. 33(11): 1845-1857.
36. Burstein E, Ganesh L, Dick RD, van De Sluis B, Wilkinson JC, Klomp LW, Wijmenga C, Brewer GJ, Nabel GJ and Duckett CS. A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1 // *EMBO J*. 2004. 23(1): 244-254.
37. Calabrese L, Carbonaro M and Musci G. Presence of coupled trinuclear copper cluster in mammalian ceruloplasmin is essential for efficient electron transfer to oxygen // *J Biol Chem*. 1989. 264(11): 6183-6187.
38. Carroll J, Fearnley IM, Skehel JM, Shannon RJ, Hirst J and Walker JE. Bovine complex I is a complex of 45 different subunits // *J Biol Chem*. 2006. 281(43): 32724-32727.
39. Carroll MC, Girouard JB, Ulloa JL, Subramaniam JR, Wong PC, Valentine JS and Culotta VC. Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004. 101(16): 5964-5969.
40. Cerveza PJ, Mehrbod F, Cotton SJ, Lomeli N, Linder MC, Fonda EG and Wickler SJ. Milk ceruloplasmin and its expression by mammary gland and liver in pigs // *Arch Biochem Biophys*. 2000. 373(2): 451-461.
41. Chen H, Attieh ZK, Su T, Syed BA, Gao H, Alaeddine RM, Fox TC, Usta J, Naylor CE, Evans RW, McKie AT, Anderson GJ and Vulpe CD. Hephaestin is a

- ferroxidase that maintains partial activity in sex-linked anemia mice // *Blood*. 2004. 103(10): 3933-3939.
42. Cherian MG and Kang YJ. Metallothionein and liver cell regeneration // *Exp Biol Med* (Maywood). 2006. 231(2): 138-144.
 43. Chilov D, Hofer T, Bauer C, Wenger RH and Gassmann M. Hypoxia affects expression of circadian genes PER1 and CLOCK in mouse brain // *FASEB J*. 2001. 15(14): 2613-2622.
 44. Chu YL, Sauble EN, Cabrera A, Roth A, Ackland ML, Mercer JF and Linder MC. Lack of ceruloplasmin expression alters aspects of copper transport to the fetus and newborn, as determined in mice // *Biometals*. 2012. 25(2): 373-382.
 45. Cobine PA, Pierrel F, Winge DR. Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes // *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1763(7): 759-772.
 46. Cousins RJ. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin // *Physiol Rev*. 1985. 65(2): 238-309.
 47. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW and Chang LY. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992. 89(21): 10405-10409.
 48. Crowe A and Morgan EH. The effects of iron loading and iron deficiency on the tissue uptake of ⁶⁴Cu during development in the rat // *Biochim Biophys Acta*. 1996. 1291(1): 53-59.
 49. Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Krems B and Gitlin JD. The copper chaperone for superoxide dismutase // *J Biol Chem*. 1997. 272(38): 23469-23472.
 50. Culotta VC, Yang M and O'Halloran TV. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal // *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1763(7): 747-758.
 51. Cursiefen C, Chen L, Borges LP, Jackson D, Cao J, Radziejewski C, D'Amore PA, Dana MR, Wiegand SJ and Streilein JW. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis

- and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment // *J Clin Invest*. 2004. 113(7): 1040-1050.
52. Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, Moehle C, Kaplan J and Klausner RD. Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport // *Cell*. 1994. 76(2): 393-402.
 53. Das SK and Ray K. Wilson's disease: an update // *Nat Clin Pract Neurol*. 2006. 2(9): 482-493.
 54. de Bie P, van de Sluis B, Klomp L and Wijmenga C. The many faces of the copper metabolism protein MURR1/COMMD1 // *J Hered*. 2005. 96(7): 803-811.
 55. De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G and Kaplan J. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin // *EMBO J*. 2007. 26(12): 2823-2831.
 56. De Feo CJ, Aller SG, Siluvai GS, Blackburn NJ and Unger VM. Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009. 106(11): 4237-4242.
 57. de Haan JB, Tymms MJ, Cristiano F and Kola I. Expression of copper/zinc superoxide dismutase and glutathione peroxidase in organs of developing mouse embryos, fetuses, and neonates // *Pediatr Res*. 1994. 35(2): 188-196.
 58. Dodani SC, Leary SC, Cobine PA, Winge DR, Chang CJ. A targetable fluorescent sensor reveals that copper-deficient SCO1 and SCO2 patient cells prioritize mitochondrial copper homeostasis // *J Am Chem Soc*. 2011. 133(22): 8606–8616.
 59. Eipper BA, Mains RE and Glembotski CC. Identification in pituitary tissue of a peptide alpha-amidation activity that acts on glycine-extended peptides and requires molecular oxygen, copper, and ascorbic acid // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983. 80(16): 5144-5148.
 60. Eipper BA, Myers AC and Mains RE. Peptidyl-glycine alpha-amidation activity in tissues and serum of the adult rat // *Endocrinology*. 1985. 116(6): 2497-2504.
 61. Eipper BA, Stoffers DA and Mains RE. The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation // *Annu Rev Neurosci*. 1992. 15: 57-85.

62. Fazekas IG, Romhanyi I, Rengei B. Copper content of fetal organs // *Kiserl Orvostud.* 1963. 15: 230-238 (цит. по: Mason KE. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man // *The Journal of Nutrition.* 1979. 109(11): 1979-2066).
63. Fedoseienko A, Bartuzi P and van de Sluis B. Functional understanding of the versatile protein copper metabolism MURR1 domain 1 (COMMD1) in copper homeostasis // *Ann N Y Acad Sci.* 2014. 1314: 6-14.
64. Fields M, Lewis CG and Lure MD. The role of the adrenals in copper deficiency // *Metabolism.* 1991. 40(5): 540-544.
65. Finney L, Mandava S, Ursos L, Zhang W, Rodi D, Vogt S, Legnini D, Maser J, Ikpat F, Olopade OI and Glesne D. X-ray fluorescence microscopy reveals large-scale relocalization and extracellular translocation of cellular copper during angiogenesis // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. 104(7): 2247-2252.
66. Fleming RE and Gitlin JD. Primary structure of rat ceruloplasmin and analysis of tissue-specific gene expression during development // *J Biol Chem.* 1990. 265(13): 7701-7707.
67. Flood DG, Reaume AG, Gruner JA, Hoffman EK, Hirsch JD, Lin YG, Dorfman KS and Scott RW. Hindlimb motor neurons require Cu/Zn superoxide dismutase for maintenance of neuromuscular junctions // *Am J Pathol.* 1999. 155(2): 663-672.
68. Fontanesi F, Soto IC and Barrientos A. Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation // *IUBMB Life.* 2008. 60(9): 557-568.
69. Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region // *Endocr Rev.* 1992. 13(2): 129-145.
70. Gaggelli E, Kozlowski H, Valensin D and Valensin G. Copper Homeostasis and Neurodegenerative Disorders (Alzheimer's, Prion, and Parkinson's Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis) // *Chem Rev.* 2006. 106: 1995-2044.
71. Gaier ED, Eipper BA and Mains RE. Copper signaling in the mammalian nervous system: synaptic effects // *J Neurosci Res.* 2013. 91(1): 2-19.

72. Gaitskhoki VS, L'Vov V M, Puchkova LV, Schwartzman AL and Neifakh SA. Highly purified ceruloplasmin messenger RNA from rat liver. Physico-chemical and functional characteristics // *Mol Cell Biochem.* 1981. 35(3): 171-182.
73. Ghosh S, May MJ and Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses // *Annu Rev Immunol.* 1998. 16: 225-260.
74. Gogvadze V, Zhivotovsky B and Orrenius S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells // *Mol Aspects Med.* 2010. 31(1): 60-74.
75. Goldfischer S, Popper H and Sternlieb I. The significance of variations in the distribution of copper in liver disease // *Am J Pathol.* 1980. 99(3): 715-730.
76. Goldfischer S and Sternlieb I. Changes in the distribution of hepatic copper in relation to the progression of Wilson's disease (hepatolenticular degeneration) // *Am J Pathol.* 1968. 53(6): 883-901.
77. Gray LW, Peng F, Molloy SA, Pendyala VS, Muchenditsi A, Muzik O, Lee J, Kaplan JH, Lutsenko S. Urinary copper elevation in a mouse model of Wilson's disease is a regulated process to specifically decrease the hepatic copper load // *PLoS One.* 2012. 7(6): e38327.
78. Greenough M, Pase L, Voskoboinik I, Petris MJ, O'Brien AW and Camakaris J. Signals regulating trafficking of Menkes (MNK; ATP7A) copper-translocating P-type ATPase in polarized MDCK cells // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004. 287(5): C1463-1471.
79. Gregoriadis G, Morell AG, Sternlieb I, Scheinberg IH (1970) Catabolism of desialylated ceruloplasmin in the liver. *J Biol Chem* 245(21): 5833–5837.
80. Gregoriadis G and Sourkes TL. Regulation of hepatic copper in the rat by the adrenal gland // *Can J Biochem.* 1970. 48(2): 160-163.
81. Guo Y, Smith K, Lee J, Thiele DJ and Petris MJ. Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter // *J Biol Chem.* 2004. 279(17): 17428-17433.
82. Gupta A and Lutsenko S. Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential // *Future Med Chem.* 2009. 1(6): 1125-1142.

83. Hanson SR, Donley SA and Linder MC. Transport of silver in virgin and lactating rats and relation to copper // *J Trace Elem Med Biol.* 2001. 15(4): 243-253.
84. Hardman B, Manuelpillai U, Wallace EM, Monty JF, Kramer DR, Kuo YM, Mercer JF and Ackland ML. Expression, localisation and hormone regulation of the human copper transporter hCTR1 in placenta and choriocarcinoma Jeg-3 cells // *Placenta.* 2006. 27(9-10): 968-977.
85. Harris Z. Aceruloplasminemia // *Journal of the Neurological Sciences.* 2003. 207(1-2): 108-109.
86. Harris ZL, Takahashi Y, Miyajima H, Serizawa M, MacGillivray RT and Gitlin JD. Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. 92(7): 2539-2543.
87. Hartmann HJ and Weser U. Copper-thionein from fetal bovine liver // *Biochim Biophys Acta.* 1977. 491(1): 211-222.
88. Healy J and Tipton K. Ceruloplasmin and what it might do // *J Neural Transm.* 2007. 114(6): 777-781.
89. Hellman NE and Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function // *Annu Rev Nutr.* 2002. 22: 439-458.
90. Hellman NE, Kono S, Mancini GM, Hoogeboom AJ, De Jong GJ and Gitlin JD. Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin // *J Biol Chem.* 2002. 277(48): 46632-46638.
91. Hendrickson DJ, Fisher JH, Jones C, Ho YS. Regional localization of human extracellular superoxide dismutase gene to 4pter-q21 // *Genomics.* 1990. 8: 736-738.
92. Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M and Schaffner W. The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression // *EMBO J.* 1994. 13(12): 2870-2875.
93. Hidalgo J, Aschner M, Zatta P and Vasak M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system // *Brain Res Bull.* 2001. 55(2): 133-145.

94. Hjalmarsson K, Marklund SL, Engstrom A, Edlund T. Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987. 84: 6340-6344.
95. Hosler JP, Ferguson-Miller S and Mills DA. Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes // *Annu Rev Biochem*. 2006. 75: 165-187.
96. Hurley LS, Keen CL and Lonnerdal B. Copper in fetal and neonatal development // *Ciba Found Symp*. 1980. 79: 227-245.
97. Huster D. Wilson disease // *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010. 24(5): 531-539.
98. Huster D, Finegold MJ, Morgan CT, Burkhead JL, Nixon R, Vanderwerf SM, Gilliam CT and Lutsenko S. Consequences of copper accumulation in the livers of the *Atp7b*^{-/-} (Wilson disease gene) knockout mice // *Am J Pathol*. 2006. 168(2): 423-434.
99. Ilyechova EY, Saveliev AN, Skvortsov AN, Babich PS, Zatulovskaia YuA, Pliss MG, Korzhevskii DE, Tsymbalenko NV, Puchkova LV. (2014) The effects of silver ions on copper metabolism in rats. *Metallomics* (Epub ahead of print).
100. Ioannoni R, Beaudoin J, Lopez-Maury L, Codlin S, Bahler J and Labbe S. Cuf2 is a novel meiosis-specific regulatory factor of meiosis maturation // *PLoS One*. 2012. 7(4): e36338.
101. Ishida S, Lee J, Thiele DJ and Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter *Ctr1* in yeast and mammals // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002. 99(22): 14298-14302.
102. Johnson PE, Milne DB and Lykken GI. Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans // *Am J Clin Nutr*. 1992. 56(5): 917-925.
103. Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME and Kopito RR. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000. 97(23): 12571-12576.

104. Kang YJ. Metallothionein redox cycle and function // *Exp Biol Med* (Maywood). 2006. 231(9): 1459-1467.
105. Karin M and Herschman HR. Dexamethasone stimulation of metallothionein synthesis in HeLa cell cultures // *Science*. 1979. 204(4389): 176-177.
106. Karlin KD. Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models // *Science*. 1993. 261(5122): 701-708.
107. Kataoka M and Tavassoli M. Ceruloplasmin receptors in liver cell suspensions are limited to the endothelium // *Exp Cell Res*. 1984. 155(1): 232-240.
108. Keen CL, Uriu-Hare JY, Hawk SN, Jankowski MA, Daston GP, Kwik-Urbe CL and Rucker RB. Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome // *Am J Clin Nutr*. 1998. 67(5 Suppl): 1003S-1011S.
109. Keller-Wood ME and Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion // *Endocr Rev*. 1984. 5(1): 1-24.
110. Kim BE, Nevitt T and Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation // *Nat Chem Biol*. 2008. 4(3): 176-185.
111. Kim BE, Turski ML, Nose Y, Casad M, Rockman HA and Thiele DJ. Cardiac copper deficiency activates a systemic signaling mechanism that communicates with the copper acquisition and storage organs // *Cell Metab*. 2010. 11(5): 353-363.
112. Kim H, Son HY, Bailey SM and Lee J. Deletion of hepatic Ctr1 reveals its function in copper acquisition and compensatory mechanisms for copper homeostasis // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009. 296(2): G356-364.
113. Kinningham K, Bi X and Kasarskis EJ. Neuronal localization of metallothioneins in rat and human spinal cord // *Neurochem Int*. 1995. 27(1): 105-109.
114. Klinman JP. The copper-enzyme family of dopamine beta-monooxygenase and peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase: resolving the chemical pathway for substrate hydroxylation // *J Biol Chem*. 2006. 281(6): 3013-3016.
115. Klomp AE, van de Sluis B, Klomp LW and Wijmenga C. The ubiquitously expressed MURR1 protein is absent in canine copper toxicosis // *J Hepatol*. 2003. 39(5): 703-709.

116. Knutson MD. Steap proteins: implications for iron and copper metabolism // *Nutr Rev.* 2007. 65(7): 335-340.
117. Kojima Y, Berger C, Vallee BL and Kagi JH. Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976. 73(10): 3413-3417.
118. Koschinsky ML, Funk WD, van Oost BA and MacGillivray RT. Complete cDNA sequence of human preceruloplasmin // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986. 83(14): 5086-5090.
119. Kozlowski H, Kolkowska P, Watly J, Krzywoszynska K, Potocki S. General Aspects of Metal Toxicity // *Curr Med Chem.* 2014 Jul 15. [Epub ahead of print].
120. Kroll J. Rocket-line immunoelectrophoresis (76) // *Scand J Immunol Suppl.* 1973. 1: 83-87.
121. Kuo YM, Gybina AA, Pyatskowitz JW, Gitschier J and Prohaska JR. Copper transport protein (Ctr1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status // *J Nutr.* 2006. 136(1): 21-26.
122. Kwon MJ, Kim B, Lee YS, Kim TY. Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation // *J Dermatol Sci.* 2012. 67(2): 81-87.
123. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. 227(5259): 680-685.
124. Leary SC, Winge DR and Cobine PA. "Pulling the plug" on cellular copper: the role of mitochondria in copper export // *Biochim Biophys Acta.* 2009. 1793(1): 146-153.
125. Lee GR, Nacht S, Lukens JN and Cartwright GE. Iron metabolism in copper-deficient swine // *J Clin Invest.* 1968. 47(9): 2058-2069.
126. Lee J, Pena MM, Nose Y and Thiele DJ. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1 // *J Biol Chem.* 2002. 277(6): 4380-4387.
127. Lee J, Prohaska JR and Thiele DJ. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. 98(12): 6842-6847.

128. Lee SH, Lancey R, Montaser A, Madani N and Linder MC. Ceruloplasmin and copper transport during the latter part of gestation in the rat // *Proc Soc Exp Biol Med*. 1993. 203(4): 428-439.
129. Liang ZD, Tsai WB, Lee MY, Savaraj N and Kuo MT. Specificity protein 1 (sp1) oscillation is involved in copper homeostasis maintenance by regulating human high-affinity copper transporter 1 expression // *Mol Pharmacol*. 2012. 81(3): 455-464.
130. Lindeque JZ, Levanets O, Louw R and van der Westhuizen FH. The involvement of metallothioneins in mitochondrial function and disease // *Curr Protein Pept Sci*. 2010. 11(4): 292-309.
131. Linder MC. Copper and genomic stability in mammals // *Mutat Res*. 2001. 475(1-2): 141-152.
132. Linz R and Lutsenko S. Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins // *J Bioenerg Biomembr*. 2007. 39(5-6): 403-407.
133. Lonnerdal B. Intestinal regulation of copper homeostasis: a developmental perspective // *Am J Clin Nutr*. 2008. 88(3): 846S-850S.
134. Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY and Dmitriev OY. Function and regulation of human copper-transporting ATPases // *Physiol Rev*. 2007. 87(3): 1011-1046.
135. Lutsenko S, Cooper MJ. Localization of the Wilson's disease protein product to mitochondria // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998. 95: 6004-6009.
136. Lynes MA, Zaffuto K, Unfricht DW, Marusov G, Samson JS and Yin X. The physiological roles of extracellular metallothionein // *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006. 231(9): 1548-1554.
137. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade // *Cell*. 1995. 83(6): 835-839.
138. Maret W. Redox biochemistry of mammalian metallothioneins // *J Biol Inorg Chem*. 2011. 16(7): 1079-1086.
139. Marklund SL. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. 79(24): 7634-7638.

140. Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L and Scambia G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample // *Biol Proced Online*. 2001. 3: 19-25.
141. Mason KE. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man // *J Nutr*. 1979. 109(11): 1979-2066.
142. McCord JM and Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) // *J Biol Chem*. 1969. 244(22): 6049-6055.
143. Mesiano S and Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex // *Endocr Rev*. 1997. 18(3): 378-403.
144. Milde M, Werthmann RC, von Hayn K and Bunemann M. Dynamics of adenylate cyclase regulation via heterotrimeric G-proteins // *Biochem Soc Trans*. 2014. 42(2): 239-243.
145. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH and Rodilla V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins // *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2000. 35(1): 35-70.
146. Mills CF and Williams RB. Copper concentration and cytochrome-oxidase and ribonuclease activities in the brains of copper-deficient lambs // *Biochem J*. 1962. 85(3): 629-632.
147. Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G and Goodman RH. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986. 83(18): 6682-6686.
148. Monty JF, Llanos RM, Mercer JF and Kramer DR. Copper exposure induces trafficking of the menkes protein in intestinal epithelium of ATP7A transgenic mice // *J Nutr*. 2005. 135(12): 2762-2766.
149. Moriya M, Ho YH, Grana A, Nguyen L, Alvarez A, Jamil R, Ackland ML, Michalczyk A, Hamer P, Ramos D, Kim S, Mercer JF and Linder MC. Copper is taken up efficiently from albumin and alpha2-macroglobulin by cultured human cells by more than one mechanism // *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008. 295(3): C708-721.

150. Mufti AR, Burstein E and Duckett CS. XIAP: cell death regulation meets copper homeostasis // *Arch Biochem Biophys*. 2007. 463(2): 168-174.
151. Mukhopadhyay CK, Mazumder B, Lindley PF and Fox PL. Identification of the prooxidant site of human ceruloplasmin: a model for oxidative damage by copper bound to protein surfaces // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. 94(21): 11546-11551.
152. Murakami M, Zheng Y, Hirashima M, Suda T, Morita Y, Ooehara J, Ema H, Fong GH and Shibuya M. VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008. 28(4): 658-664.
153. Nagano T, Itoh N, Ebisutani C, Takatani T, Miyoshi T, Nakanishi T and Tanaka K. The transport mechanism of metallothionein is different from that of classical NLS-bearing protein // *J Cell Physiol*. 2000. 185(3): 440-446.
154. Nair N, Bedwal RS and Mathur RS. Effect of adrenalectomy and adrenalectomy+hydrocortisone treatment on histopathological, biochemical and zinc and copper profiles in rat testes // *Indian J Exp Biol*. 1995. 33(9): 655-663.
155. Nair N, Bedwal RS and Mathur RS. Effect of adrenalectomy and hydrocortisone on ventral prostate of rats // *Asian J Androl*. 2001. 3(4): 289-300.
156. Nair N, Bedwal RS and Mathur RS. Effect of adrenalectomy on rat epididymidis // *Asian J Androl*. 2002. 4(4): 273-279.
157. Naryzhny SN and Lee H. Protein profiles of the Chinese hamster ovary cells in the resting and proliferating stages // *Electrophoresis*. 2001. 22(9): 1764-1775.
158. Naryzhny SN and Lee H. Observation of multiple isoforms and specific proteolysis patterns of proliferating cell nuclear antigen in the context of cell cycle compartments and sample preparations // *Proteomics*. 2003. 3(6): 930-936.
159. Nelson KT and Prohaska JR. Copper deficiency in rodents alters dopamine beta-mono-oxygenase activity, mRNA and protein level // *Br J Nutr*. 2009. 102(1): 18-28.
160. Nevitt T, Öhrvik H and Thiele DJ. Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals // *Biochem Biophys Acta*. 2012. 1823(9): 1580-1593.

161. Nishioka T, Eustace A and West C. Lysyl oxidase: from basic science to future cancer treatment // *Cell Struct Funct.* 2012. 37(1): 75-80.
162. Nordberg GF, Garvey JS and Chang CC. Metallothionein in plasma and urine of cadmium workers // *Environ Res.* 1982. 28(1): 179-182.
163. Nyasae L, Bustos R, Braiterman L, Eipper B and Hubbard A. Dynamics of endogenous ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copper-dependent redistribution between two intracellular sites // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007. 292(4): G1181-1194.
164. Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A and Fleming MD. The Steap proteins are metalloreductases // *Blood.* 2006. 108(4): 1388-1394.
165. Okado-Matsumoto A and Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria // *J Biol Chem.* 2001. 276(42): 38388-38393.
166. Okamoto M and Nonaka Y. Molecular biology of rat steroid 11 beta-hydroxylase [P450(11 beta)] and aldosterone synthase [P450(11 beta, aldo)] // *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992. 41(3-8): 415-419.
167. Okumura M, Asano M, Tagami M, Tsukiyama K and Fujinaga T. Serum copper and ceruloplasmin activity at the early growing stage in foals // *Can J Vet Res.* 1998. 62(2): 122-126.
168. Olivares C and Solano F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins // *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009. 22(6): 750-760.
169. Omoto E and Tavassoli M. The role of endosomal traffic in the transendothelial transport of ceruloplasmin in the liver // *Biochem Biophys Res Commun.* 1989. 162(3): 1346-1350.
170. Orłowski C and Piotrowski JK. Metal composition of human hepatic and renal metallothionein // *Biol Trace Elem Res.* 1998. 65(2): 133-141.
171. Osaki S, Johnson DA and Frieden E. The mobilization of iron from the perfused mammalian liver by a serum copper enzyme, ferroxidase I // *J Biol Chem.* 1971. 246(9): 3018-3023.

172. Owen JA, Padanyi R and Smith H. Serum haptoglobins and other tests in the diagnosis of hepatobiliary jaundice // *Clin Sci*. 1961. 21: 189-197.
173. Palacios O, Atrian S and Capdevila M. Zn- and Cu-thioneins: a functional classification for metallothioneins? // *J Biol Inorg Chem*. 2011. 16(7): 991-1009.
174. Pase L, Voskoboinik I, Greenough M and Camakaris J. Copper stimulates trafficking of a distinct pool of the Menkes copper ATPase (ATP7A) to the plasma membrane and diverts it into a rapid recycling pool // *Biochem J*. 2004. 378(Pt 3): 1031-1037.
175. Patel BN, Dunn RJ and David S. Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain // *J Biol Chem*. 2000. 275(6): 4305-4310.
176. Payne SL, Hendrix MJ and Kirschmann DA. Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect // *J Cell Biochem*. 2007. 101(6): 1338-1354.
177. Pecina P, Houstkova H, Hansikova H, Zeman J and Houstek J. Genetic defects of cytochrome c oxidase assembly // *Physiol Res*. 2004. 53 Suppl 1: S213-223.
178. Petering DH, Zhu J, Krezoski S, Meeusen J, Kiekenbush C, Krull S, Specher T and Dughish M. Apo-metallothionein emerging as a major player in the cellular activities of metallothionein // *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006. 231(9): 1528-1534.
179. Peters J. Local renin-angiotensin systems in the adrenal gland // *Peptides*. 2012. 34(2): 427-432.
180. Platonova N, Guolikhandanova N, Tsymbalenko N, Zhiguleva E, Zhivulko T, Vasin A, Evsukova I and Puchkova L. Milk ceruloplasmin is a valuable source of nutrient copper ions for mammalian newborns // *J Trace Elem Med Biol*. 2007. 21(3): 184-193.
181. Polishchuk R and Lutsenko S. Golgi in copper homeostasis: a view from the membrane trafficking field // *Histochem Cell Biol*. 2013. 140(3): 285-295.
182. Pope CR, De Feo CJ and Unger VM. Cellular distribution of copper to superoxide dismutase involves scaffolding by membranes // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. 110(51): 20491-20496.

183. Popovic DM. Current advances in research of cytochrome c oxidase // *Amino Acids*. 2013. 45(5): 1073-1087.
184. Porter H. Neonatal hepatic mitochondriocuprein. 3. Solubilization of the copper and protein from mitochondria of newborn liver by reduction with mercaptoethanol // *Biochim Biophys Acta*. 1968. 154(1): 236-238.
185. Porter H, Sweeney M and Porter EM. Neonatal Hepatic Mitochondriocuprein. Ii. Isolation of the Copper-Containing Subfraction from Mitochondria of Newborn Human Liver // *Arch Biochem Biophys*. 1964. 104: 97-101.
186. Prohaska JR. Impact of copper limitation on expression and function of multicopper oxidases (ferroxidases) // *Adv Nutr*. 2011. 2(2): 89-95.
187. Prohaska JR, Bailey WR and Lear PM. Copper deficiency alters rat peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase activity // *J Nutr*. 1995. 125(6): 1447-1454.
188. Prohaska JR and Broderius M. Plasma peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM) and ceruloplasmin are affected by age and copper status in rats and mice // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2006. 143(3): 360-366.
189. Prohaska JR, Broderius M and Brokate B. Metallochaperone for Cu,Zn-superoxide dismutase (CCS) protein but not mRNA is higher in organs from copper-deficient mice and rats // *Arch Biochem Biophys*. 2003. 417(2): 227-234.
190. Prohaska JR, Tamura T, Percy AK and Turnlund JR. In vitro copper stimulation of plasma peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase in Menkes disease variant with occipital horns // *Pediatr Res*. 1997. 42(6): 862-865.
191. Prohaska JR, Wittmers LE, Jr. and Haller EW. Influence of genetic obesity, food intake and adrenalectomy in mice on selected trace element-dependent protective enzymes // *J Nutr*. 1988. 118(6): 739-746.
192. Prudovsky I. Nonclassically secreted regulators of angiogenesis // *Angiol Open Access*. 2013. 1(1): 1000101.

193. Puig S, Lee J, Lau M and Thiele DJ. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake // *J Biol Chem*. 2002. 277(29): 26021-26030.
194. Puig S and Thiele DJ. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution // *Curr Opin Chem Biol*. 2002. 6(2): 171-180.
195. Pulido P, Kagi JH and Vallee BL. Isolation and some properties of human metallothionein // *Biochemistry*. 1966. 5(5): 1768-1777.
196. Qin Z, Itoh S, Jeney V, Ushio-Fukai M and Fukai T. Essential role for the Menkes ATPase in activation of extracellular superoxide dismutase: implication for vascular oxidative stress // *FASEB J*. 2006. 20(2): 334-336.
197. Quintanar L, Gebhard M, Wang TP, Kosman DJ and Solomon EI. Ferrous binding to the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and human ceruloplasmin: contributions to ferroxidase activity // *J Am Chem Soc*. 2004. 126(21): 6579-6589.
198. Rakhit R and Chakrabartty A. Structure, folding, and misfolding of Cu,Zn superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis // *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1762(11-12): 1025-1037.
199. Raven PW, McCredie E, McAuley M and Vinson GP. Origins of the differences in function of rat adrenal zona glomerulosa cells incubated as intact tissue and as collagenase-prepared cell suspensions // *Cell Biochem Funct*. 1983. 1(1): 17-24.
200. Rees EM, Lee J and Thiele DJ. Mobilization of intracellular copper stores by the *ctr2* vacuolar copper transporter // *J Biol Chem*. 2004. 279(52): 54221-54229.
201. Roelofsen H, Wolters H, Van Luyn MJ, Miura N, Kuipers F and Vonk RJ. Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion // *Gastroenterology*. 2000. 119(3): 782-793.
202. Roeser HP, Lee GR, Nacht S and Cartwright GE. The role of ceruloplasmin in iron metabolism // *J Clin Invest*. 1970. 49(12): 2408-2417.
203. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX and et al. Mutations in Cu/Zn superoxide

- dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis // *Nature*. 1993. 362(6415): 59-62.
204. Rosol TJ, Yarrington JT, Latendresse J and Capen CC. Adrenal Gland: Structure, Function, and Mechanisms of Toxicity // *Toxicologic Pathology*. 2001. 29(1): 41-48.
205. Rubino JT and Franz KJ. Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function // *J Inorg Biochem*. 2012. 107(1): 129-143.
206. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* // New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition. 1989. Vol. 1–3.
207. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV and Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes // *Nat Protoc*. 2006. 1(6): 2856-2860.
208. Srai SK, Burroughs AK, Wood B and Epstein O. The ontogeny of liver copper metabolism in the guinea pig: clues to the etiology of Wilson's disease // *Hepatology*. 1986. 6(3): 427-432.
209. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain // *J Biol Chem*. 2002. 277(47): 44784-44790.
210. Stathopoulos PB, Rumfeldt JA, Scholz GA, Irani RA, Frey HE, Hallewell RA, Lepock JR and Meiering EM. Cu/Zn superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis show enhanced formation of aggregates in vitro // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100(12): 7021-7026.
211. Steveson TC, Ciccotosto GD, Ma XM, Mueller GP, Mains RE and Eipper BA. Menkes protein contributes to the function of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase // *Endocrinology*. 2003. 144(1): 188-200.
212. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M and Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia // *FASEB J*. 2001. 15(13): 2445-2453.

213. Stuehler B, Reichert J, Stremmel W and Schaefer M. Analysis of the human homologue of the canine copper toxicosis gene MURR1 in Wilson disease patients // *J Mol Med (Berl)*. 2004. 82(9): 629-634.
214. Sutherland DE and Stillman MJ. The "magic numbers" of metallothionein // *Metallomics*. 2011. 3(5): 444-463.
215. Suzuki KT, Someya A, Komada Y and Ogra Y. Roles of metallothionein in copper homeostasis: responses to Cu-deficient diets in mice // *J Inorg Biochem*. 2002. 88(2): 173-182.
216. Takahashi Y, Kako K, Arai H, Ohishi T, Inada Y, Takehara A, Fukamizu A and Munekata E. Characterization and identification of promoter elements in the mouse COX17 gene // *Biochim Biophys Acta*. 2002. 1574(3): 359-364.
217. Tao TY, Liu F, Klomp L, Wijmenga C and Gitlin JD. The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with the Wilson disease protein // *J Biol Chem*. 2003. 278(43): 41593-41596.
218. Tapia L, Gonzalez-Aguero M, Cisternas MF, Suazo M, Cambiazo V, Uauy R and Gonzalez M. Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supra-physiological exposure levels // *Biochem J*. 2004. 378(Pt 2): 617-624.
219. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. // *Biomed Pharmacother*. 2003. 57(9): 386-98.
220. Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G and Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology // *World J Surg Oncol*. 2011. 9: 54.
221. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R and Yoshikawa S. Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å // *Science*. 1995. 269(5227): 1069-1074.
222. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R and Yoshikawa S. The whole structure of the 13-

- subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å // *Science*. 1996. 272(5265): 1136-1144.
223. Turski ML, Brady DC, Kim HJ, Kim BE, Nose Y, Counter CM, Winge DR and Thiele DJ. A novel role for copper in Ras/mitogen-activated protein kinase signaling // *Mol Cell Biol*. 2012. 32(7): 1284-1295.
224. Turski ML and Thiele DJ. New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease // *J Biol Chem*. 2009. 284(2): 717-721.
225. Umesono K and Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors // *Cell*. 1989. 57(7): 1139-1146.
226. Vachette P, Dainese E, Vasylijev VB, Di Muro P, Beltramini M, Svergun DI, De Filippis V and Salvato B. A key structural role for active site type 3 copper ions in human ceruloplasmin // *J Biol Chem*. 2002. 277(43): 40823-40831.
227. van De Sluis B, Rothuizen J, Pearson PL, van Oost BA and Wijmenga C. Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population // *Hum Mol Genet*. 2002. 11(2): 165-173.
228. van den Berghe PV, Folmer DE, Malingre HE, van Beurden E, Klomp AE, van de Sluis B, Merckx M, Berger R and Klomp LW. Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake // *Biochem J*. 2007. 407(1): 49-59.
229. Varada KR, Harper RG and Wapnir RA. Development of copper intestinal absorption in the rat // *Biochem Med Metab Biol*. 1993. 50(3): 277-283.
230. Vasak M and Meloni G. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins // *J Biol Inorg Chem*. 2011. 16(7): 1067-1078.
231. Vashchenko G and MacGillivray RT. Multi-copper oxidases and human iron metabolism // *Nutrients*. 2013. 5(7): 2289-2313.
232. Vassiliev V, Harris ZL and Zatta P. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases // *Brain Res Brain Res Rev*. 2005. 49(3): 633-640.
233. Vest KE, Leary SC, Winge DR, Cobine PA. Copper import into the mitochondrial matrix in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Pic2, a mitochondrial carrier family protein // *J Biol Chem*. 2013. 288(33): 23884–23892.

234. Vinson GP. Glomerulosa function and aldosterone synthesis in the rat // *Mol Cell Endocrinol.* 2004. 217(1-2): 59-65.
235. Vinson GP. The adrenal cortex and life // *Mol Cell Endocrinol.* 2009. 300(1-2): 2-6.
236. Vives-Bauza C, Starkov A and Garcia-Arumi E. Measurements of the antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase // *Methods Cell Biol.* 2007. 80: 379-393.
237. Walravens PA. Nutritional importance of copper and zinc in neonates and infants // *Clin Chem.* 1980. 26(2): 185-189.
238. Wee NK, Weinstein DC, Fraser ST and Assinder SJ. The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease // *Int J Biochem Cell Biol.* 2013. 45(5): 960-963.
239. Weisenberg E, Halbreich A and Mager J. Biochemical lesions in copper-deficient rats caused by secondary iron deficiency. Derangement of protein synthesis and impairment of energy metabolism // *Biochem J.* 1980. 188(3): 633-641.
240. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression // *FASEB J.* 2002. 16(10): 1151-1162.
241. Wikstrom MK. Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria // *Nature.* 1977. 266(5599): 271-273.
242. Winkler C, Denker K, Wortelkamp S and Sickmann A. Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS // *Electrophoresis.* 2007. 28(12): 2095-2099.
243. Xu X, Pin S, Gathinji M, Fuchs R and Harris ZL. Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis // *Ann N Y Acad Sci.* 2004. 1012: 299-305.
244. Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, Somcio R, Bauer TW, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells // *Cancer Res.* 2006. 66:46-51.

245. Yoshida Y, Furuta S and Niki E. Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron // *Biochim Biophys Acta*. 1993. 1210(1): 81-88.
246. Young SN and Curzon G. A method for obtaining linear reciprocal plots with caeruloplasmin and its application in a study of the kinetic parameters of caeruloplasmin substrates // *Biochem J*. 1972. 129(2): 273-283.
247. Zaitsev VN, Zaitseva I, Papiz M and Lindley PF. An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma // *J Biol Inorg Chem*. 1999. 4(5): 579-587.
248. Zatulovskiy EA, Skvortsov AN, Rusconi P, Ilyechova EY, Babich PS, Tsymbalenko NV, Broggin M and Puchkova LV. Serum depletion of holo-ceruloplasmin induced by silver ions in vivo reduces uptake of cisplatin // *J Inorg Biochem*. 2012. 116: 88-96.
249. Zhou B and Gitschier J. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997. 94(14): 7481-7486.
250. Zischka H, Lichtmanegger J, Schmitt S, Jägemann N, Schulz S, Wartini D, Jennen L, Rust C, Larochette N, Galluzzi L, Chajes V, Bandow N, Gilles VS, DiSpirito AA, Esposito I, Goettlicher M, Summer KH, Kroemer G. Liver mitochondrial membrane crosslinking and destruction in a rat model of Wilson disease // *J Clin Invest*. 2011. 121(4): 1508–1518.