

УДК 577.21

Т.В.Живулько (асп., каф. БФ), Н.В.Цымбаленко, д.б.н., доц. ГУ НИИЭМ РАМН

## МЕСТО И ВРЕМЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ПЕРЕНОС МЕДИ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС

Медь относится к незаменимым микроэлементам и входит в активные центры ферментов, контролирующих клеточное дыхание, фотосинтез, формирование соединительной ткани, функционирование центральной нервной системы, перенос железа и другие фундаментальные клеточные процессы. При этом свободные ионы меди оказывают токсическое действие, так как при прямом контакте окисляют все типы биомолекул. Безопасный круговорот меди в клетках осуществляет специальная система белков - метаболическая система меди (МСМ). У млекопитающих различают два типа МСМ. В период эмбрионального развития и молочного вскармливания МСМ функционирует по эмбриональному типу, который характеризуется низким содержанием меди в крови, накоплением ее в печени и отсутствием экскреции меди в желчь. К окончанию периода молочного вскармливания происходит смена эмбрионального типа МСМ на взрослый. Это выражается в снижении содержания меди в печени, повышении ее концентрации в крови и формировании механизма выведения меди через желчь. Врожденные или приобретенные (экологические факторы, избыток/недостаток меди в пище) нарушения в функционировании МСМ приводят к нарушению баланса ионов меди и железа, что вызывает развитие тяжелых нейродегенеративных заболеваний. Особенно важно поддержание баланса этих микроэлементов в раннем онтогенезе. При этом молекулярно-генетические механизмы, контролирующие смену типов МСМ, пока остаются неизученными.

В работе было изучено распределение меди в крови, спинномозговой жидкости (СМЖ), печени и мозге, а также steady state уровень мРНК, программирующих ЦП, GPI-ЦП, CTR1, ATR7A и ATR7B в мозге, печени и сердце новорожденных крыс, вскормленных самками (контрольная группа) и молочной смесью (опытная группа) в различные периоды онтогенеза.

Транскрипционная активность генов измерена методом полуколичественного ОТ-ПЦР анализа, который позволяет определить steady state уровень мРНК и выявить изоформы мРНК, формирующиеся из первичных продуктов транскрипции. Для выявления полипептидов изучаемых белков использован гиперчувствительный иммуноблоттинг со специфическими антителами. Результаты выражены в произвольных единицах, как отношение количества образовавшегося ПЦР-продукта данной мРНК к количеству ПЦР-продукта  $\beta$ -актина, синтезированного на этих же препаратах РНК в этих же опытах. Концентрация меди измерена методом атомно-абсорбционной спектрометрии.

Искусственное вскармливание проводили молочной смесью, рекомендованной для новорожденных с 0 дня жизни. Смесь приготавливали так, чтобы содержание белка в ней соответствовало содержанию белка в молоке крыс. Определения проводили на 5, 6, 8 и 16 дни жизни. Полученные результаты показывают, что при вскармливании молочными смесями у крысят происходит преждевременное перераспределение меди между печенью и кровью. При этом концентрация ионов меди в крови и печени крысят опытной группы в несколько раз выше, чем у контрольной группы. Концентрация меди в мозгу практически не отличается от контрольной группы и не меняется в онтогенезе, но в СМЖ крысят опытной

группы возрастает многократно, по сравнению с контрольной группой. Уровень ЦП в крови и в СМЖ повышается пропорционально росту концентрации меди. При этом в печени происходит активация гена ЦП. Так как ЦП крови не пересекает гематоэнцефалический барьер, повышение ЦП в СМЖ может рассматриваться как индукция активности гена ЦП в мозге. Расчетная плотность атомов меди на 1 молекулу ЦП в СМЖ почти в 2 раза выше, чем в крови. Однако они, практически все, связаны с ЦП.

Steady state уровень мРНК, кодирующих ЦП, GPI-ЦП, CTR1, ATR7A и ATR7B в онтогенезе, определен в мозге, печени и сердце у крысят контрольной и опытной (вскармливаемых молочной смесью) групп. Определения проводили на 20-й день эмбрионального развития и 3, 5, 6, 10 (эмбриональный тип метаболизма меди), а также на 22 и 30-й дни после рождения (взрослый тип метаболизма меди).

Уровень активности гена *Ctrl* в печени крысят контрольной группы достигает максимума к 5-му дню жизни, в то время, как концентрация меди в печени стремительно нарастает и достигает максимума в ядрах. Содержание ЦП-мРНК в это время в печени находится на низком уровне, ген *Atp7b* не активен. В сердце и мозге содержание CTR1-мРНК снижается после смены типа метаболизма меди.

У крысят опытной группы снижение активности гена *Ctrl* в исследуемых органах резко повышалось в первые дни после рождения и снижалось уже к 6-му дню жизни. В печени крысят опытной группы активировались гены *ЦП* и *Atp7b*. Также была найдена GPI-ЦП мРНК. В печени крысят контрольной группы эта молекулярная форма не обнаруживалась. Steady state уровень ЦП-мРНК в мозге крысят опытной группы была выше, чем у взрослых крыс. С этими данными коррелируют изменения концентрации меди в мозгу в раннем онтогенезе. Неожиданным является присутствие обеих изоформ ЦП-мРНК в сердце. У взрослых крыс и у крысят контрольной группы ген ЦП в этом органе не активен. Ген *Atp7a* активен во всех органах новорожденных крыс, и вскармливание молочной смесью мало влияет на его активность.

В совокупности данные указывают на связь между формой ионов меди, поступающих в организм новорожденных, и уровнем экспрессии генов, осуществляющих их перенос. При этом наблюдается отклонение от закономерностей их экспрессии при естественном вскармливании. Очевидно, что свободные ионы меди в пище оказывают влияние на метаболизм меди в таких важных органах, как печень, мозг и сердце.