

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛИ МЕДЬ-ДЕФИЦИТНЫХ КРЫС
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ПЕРЕНОСА ЦИСПЛАТИНА
В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Медь является одним из важнейших микроэлементов практически для всех живых организмов, поскольку она входит в состав ряда жизненно важных ферментов в клетках различных типов. В то же время в свободном состоянии ионы меди для клеток токсичны, так как они индуцируют образование высокоактивных радикалов, способных окислять различные виды биомолекул. Безопасное поступление меди в клетки, ее перенос к местам образования купроэнзимов и выведение из клеток обеспечивает специальная система белков — метаболическая система меди (МСМ). Даже незначительные нарушения работы МСМ приводят к развитию нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, остеопороза, а также к росту опухолей. Поэтому актуальным является поиск и создание природных и экспериментальных моделей, позволяющих *in vivo* изучать механизмы, обеспечивающие поддержание гомеостаза меди в различных органах млекопитающих, находящихся на разных этапах онтогенеза.

Известно, что добавление хлорида серебра в пищу лабораторных крыс через 2-3 недели приводит к резкому снижению концентрации меди в плазме их крови. Целью настоящего исследования было охарактеризовать животную модель с дефицитом меди, вызванным искусственно путём добавления в пищу ионов $Ag(I)$, которые изоэлектронны ионам $Cu(I)$.

Крысы, получавшие с пищей ионы серебра (Ag-крысы), были активны, не теряли вес и аппетит, у них не наблюдалось расстройств пищеварения. Это полностью согласуется с данными об отсутствии у ионов серебра токсических свойств. Через четыре недели оксидазная активность сыворотки крови, в норме практически полностью принадлежащая церулоплазмину (ЦП), медьсодержащему белку сыворотки крови, у Ag-крыс снижалась примерно в 20 раз. На фоне отсутствия оксидазной активности, выявляемой орто-дианизидином, в крови Ag-крыс, по данным иммуноблотинга, содержание ЦП практически не меняется. Однако соотношение апо-ЦП/холо-ЦП в крови крыс опытной группы, по сравнению с контрольной, смещено в сторону апо-ЦП. Концентрация меди в сыворотке крови Ag-крыс снижается почти в 10 раз. Эти данные полностью коррелируют с потерей церулоплазмином оксидазной активности.

В печени крыс опытной группы, по сравнению с контрольной, содержание меди снижается незначительно. При этом концентрация серебра в печени превышает фоновые значения почти в 60 раз. Путём равновесного центрифугирования в ступенчатом градиенте сахарозы нам удалось установить, что серебро, поступающее в клетки печени, концентрируется, главным образом, в митохондриальной фракции. Кроме того, после отмены кормления животных серебром происходит выведение Ag из их печени, и это говорит о том, что серебро концентрируется в митохондриях в растворимой форме и способно в дальнейшем взаимодействовать с компонентами транспортной системы.

Для того чтобы установить, влияет ли отсутствие меди в крови и/или накопление серебра в печени на экспрессию генов метаболической системы меди, было определено относительное содержание мРНК, кодирующих 1) ЦП, медьтранспортную ферроксидазу, 2) CTR1, универсальный импортер меди, 3) АТР7В, медьтранспортную АТФазу Р1 типа, которая включает ионы меди в активные центры ЦП, а также 4) APP, участвующий в восстановлении меди у клеточной поверхности, которое предшествует связыванию меди с CTR1. Помимо этого, проверено, не происходит ли индукция формирования мРНК,

кодирующих ГФИ-ЦП и АТР7А, которые в нормальных условиях в гепатоцитах не образуются. Полученные результаты показывают, что профиль экспрессии взятых в рассмотрение медьтранспортных генов в печени Ag-крыс не меняется. Уровень экспрессии практически всех генов этой группы не меняется. Только относительное количество АТР7В-мРНК увеличивается почти в два раза. Практически не изменяется относительный уровень экспрессии генов, кодирующих СОД2 и IV субъединицу цитохром С-оксидазы (ЦО). В то же время содержание мРНК СОД1 существенно повышается. Полученные данные свидетельствуют о том, что ион Ag(I), изоэлектронный меди(I), возможно, успешно использует транспортеры Cu(I) для поступления в клетки печени.

В последние годы получены убедительные данные, свидетельствующие о том, что широко применяемый противораковый препарат цисплатин переносится в клетки с участием CTR1, белка плазматической мембраны, принадлежащего к семейству высоко аффинных импортеров меди. Однако трудно представить, что платина(II), координационная химия которой принципиально отличается от химии меди(I), связывается и передается в клетку по идентичному с Cu(I)-ионами механизму. N-концевой внеклеточный домен CTR1 длиной 65 аминокислотных остатков содержит три мотива, обогащенных гистидином и/или метионином (мотив 1: ¹MDHSHHMGMSYMD¹³, мотив 2: ¹⁹QPSHHHPT²⁶ и мотив 3: ³⁹SMMMMPMT⁴⁶). Все мотивы важны для переноса Cu(I). Какие из них принимают участие в транспорте цисплатина, остается не изученным. Мы предполагаем, что, благодаря способности платины быстро образовывать кинетически предпочтительные комплексы с серой, критическую роль в связывании цисплатина могут играть метионин-богатые мотивы CTR1 и в особенности ближайший к плазматической мембране мотив 3. Так как ионы меди вытесняют платину из ее комплексов с S-донорами, возможно, что ионы меди, связанные с мотивом 2, могут вызывать диссоциацию платины из комплекса с атомами серы метионина и способствовать ее попаданию в купрофильную пору CTR1.

Так как во внеклеточном пространстве Ag-крыс медь отсутствует, а экспрессия медьтранспортных генов не нарушена, то можно считать, что эти крысы являются подходящей моделью для изучения связи между транспортом цисплатина и меди в клетки. Крысам внутрибрюшинно был введен цисплатин в концентрации 7 мг/кг веса тела (LD₅₀). Через 40 мин животных декапитировали, и в сыворотке крови, печени, почках, мозге и в мочевом пузыре измеряли концентрацию платины. Полученные данные, показывают, что распределение платины в организме контрольной крысы полностью соответствует данным литературы. Так, в сыворотке крови платина практически не найдена, она концентрируется главным образом в печени, почках и особенно в мочевом пузыре. Напротив, у Ag-крысы платина остается в сыворотке крови и в органы не поступает. Кроме того, наблюдение за крысами в течение двух недель после внутрибрюшинного введения полуметальной дозы цисплатина дало следующие результаты. Пять из 10 крыс контрольной группы погибли на третьи и четвертые сутки после введения цисплатина. Из 10 Ag-крыс семь крыс погибли только после 6-х суток. Эти данные поддерживают наше предположение об участии ионов меди в поступлении цисплатина в клетки. По-видимому, CTR1 переносит цисплатин не как специфический транспортер, а скорее как участник транспорта меди, имеющий расположенные рядом внеклеточный метиониновый кластер и мотив, «собирающий» медь у клеточной поверхности. Нельзя исключить, что на фоне введения ионов серебра цисплатин может действовать более избирательно на опухолевые клетки. Возможно также, что снижение содержания меди в кровотоке под влиянием ионов серебра может само по себе оказывать подавляющее действие на рост опухолей, активно делящиеся клетки которых остро нуждаются в ионах меди.