

УДК 574.352.3

©Коллектив авторов

**ПРОЯВЛЕНИЕ ЭФФЕКТА ИМПРИНТИНГА В ПАТТЕРНЕ  
ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ МЕДИ В ПЕЧЕНИ  
ПОСЛЕ МНОГОКРАТНЫХ ВВЕДЕНИЙ СЕРНОКИСЛОЙ МЕДИ**

***А.И. Божков<sup>1\*</sup>, В.И. Сидоров<sup>1</sup>, В.Л. Длубовская<sup>1</sup>, М.Я. Шевцова<sup>1</sup>, Ю.Н. Суров<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>НИИ биологии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина,  
пл. Свободы, 4, 61077 Харьков; эл. почта: bozhkov@univer.kharkov.ua

<sup>2</sup>НИИ химии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина,  
пл. Свободы, 4, 61077 Харьков

Из цитозоля клеток печени крыс выделена фракция белков, специфически связывающая ионы меди. Эти медьсвязывающие белки (МСБ) имеют молекулярную массу 10-14 кДа и принимают участие в формировании специфического паттерна внутриклеточного распределения ионов меди. Обнаружен эффект импринтинга специфического паттерна внутриклеточного распределения ионов меди, который проявлялся спустя 30 дней после многократного последовательного введения в организм сернокислй меди. Показано, что в зависимости от схемы введения сернокислй меди в организм, способность МСБ связывать ионы меди может увеличиваться в десятки раз.

**Ключевые слова:** импринтинг, внутриклеточная локализация, ионы меди, медьсвязывающие белки.

**ВВЕДЕНИЕ.** Ионы меди являются эссенциальными элементами и входят в состав не менее 40 ферментов [1, 2]. Они способны образовывать комплексы с различными соединениями в организме и, в зависимости от дозы, ионы меди в организме могут проявлять различные эффекты [3]. Было показано, что биологическое действие ионов тяжелых металлов зависит не только от дозы ионов металла, но и от функционального состояния биологических систем [4, 5]. Это может объясняться тем, что функциональное состояние, вероятно, оказывает влияние на характер связывания ионов меди с компонентами клеток, скорость их экстракции и формирования специфического паттерна внутриклеточного

---

\* - адресат для переписки

распределения этих ионов. Однако, механизмы, определяющие характер внутриклеточного распределения ионов меди, остаются мало исследованными. Вместе с тем, эти знания необходимы для понимания процессов адаптации к ионам тяжелых металлов и механизмов токсичности.

Ранее было высказано предположение, что в биологических системах функционирует механизм последовательного дозо-зависимого связывания ионов металлов с компонентами клетки, и этим могут объясняться описанные три стадии действия ионов меди на функциональную активность биологических систем [3]. Можно полагать, что реализация дозо-зависимого эффекта обеспечивается наличием белков, специфически связывающих ионы меди, в частности, металлотионеинов и других стресс-белков [6, 7].

Было обнаружено, что в результате многократных последовательных введений сернокислой меди в организм в нем формируется резистентность даже к летальным для данного организма дозам ионов меди [4, 8]. Уже сложилось мнение об участии стресс-белков в формировании устойчивости организма к соответствующим стресс-факторам [9-11]. Можно полагать, что эти белки специфически связывают ионы меди и формируют паттерн внутриклеточного распределения ионов меди, что и определяет биологическое действие ионов металлов.

Нет сомнений, что одним из важнейших факторов в формировании резистентности организма к токсическим воздействиям является также и временной фактор. В частности, временные интервалы между введениями токсиканта в организм. И одним из наиболее важных вопросов в этой связи является исследование механизмов длительного сохранения резистентности организма, т.е. импринтинга к действию ионов меди и других токсикантов. Все эти вопросы изучены крайне недостаточно и представляют интерес в исследовании механизмов адаптации организма к ионам тяжелых металлов.

В настоящей работе проверялась гипотеза последовательного дозо-зависимого связывания ионов меди с различными компартментами клеток печени и возможность формирования импринтинга паттерна внутриклеточного распределения ионов меди [3]. Согласно этой гипотезе, в клетке существуют специфические медьсвязывающие белки, которые обеспечивают депонирование, внутриклеточный транспорт и, возможно, элиминацию ионов меди. При насыщении этих белков ионами меди, ионы меди связываются с другими функционально активными молекулами в клетке, что ведет к проявлению токсичности. В процессе адаптации организма формируется специфический паттерн внутриклеточного распределения ионов меди, и он зависит от схемы введения этого токсиканта и функционального состояния организма. Установившийся паттерн внутриклеточного распределения ионов меди может сохраняться достаточно долго, т.е. для него может проявляться эффект импринтинга, что и лежит в основе адаптации организма к высоким концентрациям ионов меди.

Для проверки этой гипотезы использовали различные схемы последовательного многократного введения животным сернокислой меди. Так как наибольшее количество ионов меди связывается с печенью [12], в работе анализировали внутриклеточный характер распределения ионов меди в клетках печени. Для этого выделяли фракцию медьсвязывающих белков из цитозоля клеток печени и определяли количество связываемых *in vivo* ионов меди с различными компартментами клетки, в частности с белками цитозоля, фракцией микросом и митохондрий клеток печени и возможное сохранение паттерна распределения меди спустя 1 месяц после ее последнего введения в организм.

**МЕТОДИКА.** Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Вистар 3-4 месячного возраста. Животным вводили внутрибрюшинно сернокислую медь на физрастворе в различной концентрации, используя разные схемы введения. Однократное введение 1 мг/100 г массы за 24 ч до забоя и многократные последовательные введения по таким схемам: 0,15 мг, спустя 48 ч этим же животным 0,3 мг, через 48 ч 0,6 мг и последнее введение также через 48 ч 1 мг

на каждые 100 г массы животного, а спустя 24 ч животных забивали под эфирным наркозом, т.е. эту схему обозначали как 0,15 + 0,3 + 0,6 + 1,0. Использовали также схему 0,15 + 0,3 + 0,6 + 2,0 и 1+1+1. Для проверки эффекта импринтинга группе животных вводили сернокислую медь по схеме 1+1+1, спустя 30 дней этим же животным вновь вводили сернокислую медь по той же схеме 1+1+1. Через 24 ч их забивали под эфирным наркозом. Интервал между последовательными введениями всегда составлял 48 ч. В течение всего эксперимента животные содержались в индивидуальных клетках.

Во всех случаях животных забивали под эфирным наркозом. Печень перфузировали 0,9% NaCl и делили на две части. Одну часть гомогенизировали в 0,01 М Трис-HCl pH 7.4 и использовали для получения цитозоля и выделения термостабильных белков цитозоля (ТБЦ) и медьсвязывающих белков (МСБ). Для этого гомогенат центрифугировали при 100000 g 60 мин. Надосадочную жидкость - цитозоль - подвергали термообработке при 80°C, 3 мин, и оставляли на ночь в холодильнике. Затем центрифугировали при 3000 g 10 мин, осадок удаляли, надосадочная жидкость – термостабильная фракция белков цитозоля – ТБЦ.

Другую часть печени гомогенизировали в 0,25 М сахарозе и использовали для выделения митохондрий, микросом и общего цитозоля [13]. Для этого гомогенат печени центрифугировали при 3000 g 10 мин, надосадочную жидкость собирали и центрифугировали при 10000 g 15 мин для осаждения митохондрий. Постмитохондриальную надосадочную жидкость центрифугировали при 100000 g 60 мин для осаждения микросом, а полученную надосадочную жидкость использовали как цитозоль.

В полученных фракциях определяли содержание ионов меди и белка. Для этого из полученных фракций экстрагировали липиды смесью хлороформ/метанол 1:2 [14], затем определяли в экстракте количество белка по Лоури и ионов меди методом атомно-абсорбционной спектроскопии (SELM C-600).

Очистку медьсвязывающих белков (МСБ) проводили на колонке с сефадексом G-75, уравновешенной фосфатным буфером pH 7,4. Длина колонки – 20 см, ширина – 1,6 см. На колонку наносили 3 мл образца ТБЦ с концентрацией белка 1 мг/мл, затем белки элюировали тем же буфером, объем собираемых фракций – 4 мл. Элюирование проводили объемом буфера равным объему колонки. Во всех фракциях определяли содержание меди и белка в полученных фракциях. Фракции, содержащие медь собирали, концентрировали на роторном испарителе до объема 1,5 мл, повторно наносили на колонку, элюировали в тех же условиях и определяли в полученных фракциях количество ионов меди и белка.

Электрофорез белков проводили в градиентном ПААГ (7-24%) по известному методу [15], после окрашивания фракций проводили денситометрию.

Спектры поглощения в УФ области определяли при помощи двухканального спектрофотометра СФ-24, в ИК области – при помощи спектрофотометра SPECORD 75IR, образцы измеряли в таблетках KBr с 1-2% исследуемого вещества в диапазоне 4000–400 см<sup>-1</sup>.

Все эксперименты повторяли не менее трех-пяти раз, полученные значения усредняли и рассчитывали стандартное отклонение и достоверные различия.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

*Выделение и характеристика медьсвязывающих белков цитозоля клеток печени.* Экспериментальной группе животных трижды последовательно вводили сернокислую медь с интервалом между введениями 48 часов. Спустя 24 часа после последнего введения из печени этих животных выделяли цитозоль, микросомы, митохондрии и термостабильную фракцию белков цитозоля (ТБЦ), в которой присутствуют металлотионеины и другие стресс-белки [16].

Оказалось, что при такой схеме введения сернокислой меди белки цитозоля связывали (0,27±0,02) мкг ионов меди / мг белка, а белки фракции ТБЦ - в 5 раз больше ионов меди – (1,40±0,18) (табл. 1).

## ИМПРИНТИНГ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ МЕДИ

Таблица 1. Содержание ионов меди (мкг ионов  $\text{Cu}^{2+}$ /1 мг белка) во фракциях общего цитозоля, фракции термостабильных белков цитозоля и медьсвязывающих белков, выделенных из печени 3-месячных животных, получавших серноокисную медь по схеме 1+1+1. Содержание ионов меди определяли через 24 ч после последнего введения

Фракции	Содержание ионов меди (мкг/мг белка)
Общие белки цитозоля	0,27±0,02
Термостабильная белковая фракция (ТБЦ)	1,40±0,18
Медь связывающие белки (МСБ)	7,31±1,54

На колонке с сефадексом G-75 ТБЦ разделялись на 3 фракции (рис. 1). Определение содержания ионов меди в этих фракциях показало, что небольшое количество меди связывалось с первой фракцией, а основное ее количество было связано со второй фракцией белка; в третьей фракции ионы меди не выявлялись (рис. 1).

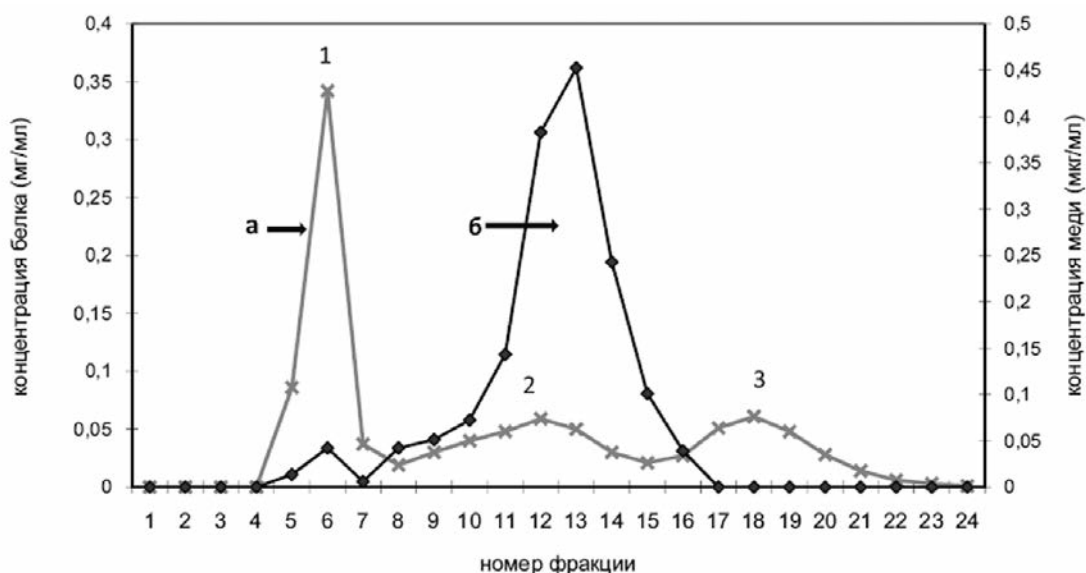


Рисунок 1.

Фракционирование ТБЦ на колонке с сефадексом G-75. Фракции белков - 1, 2 и 3;

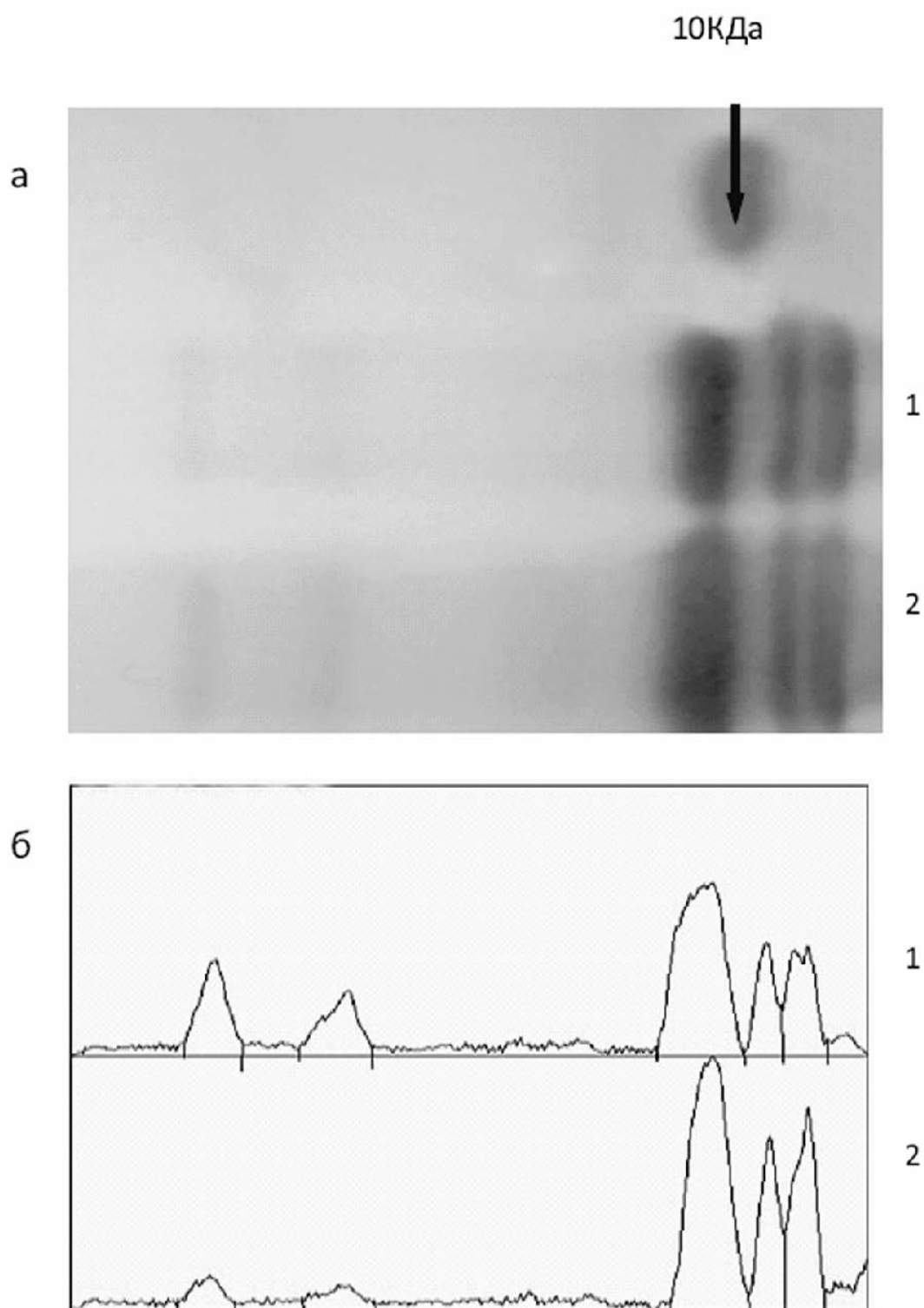
а - содержание белка, б - количество меди, связанной с белком.

Длина колонки - 20 см, ширина - 1,6 см, объем собираемых фракций - 4 мл.

Следовательно, в группе ТБЦ присутствует белок или белки, вероятно, специфически связывающий большие количества ионов меди в организме. Необходимо отметить, что на вторую фракцию ТБЦ приходится около 15-20% белка от всех ТБЦ.

Хроматографически очищенная вторая фракция ТБЦ связывала до 7 мкг ионов меди / мг белка или в 27 раз больше по сравнению с общим белком цитозоля и может быть отнесена к медьсвязывающим белкам цитозоля (МСБ) (табл. 1, рис. 1).

Электрофоретическое разделение МСБ показало, что эти белки представлены как минимум 5 фракциями: 1 – около 16%, 2 – 12%, 3 – 45%, 4 – 12% и 5 – 15%. Соотношение фракций этих белков было практически одинаковым в контроле и опыте (рис. 2). Основная фракция МСБ (50%) имела молекулярную массу 10-14 кДа (рис. 2) и была принята за медьсвязывающие белки цитозоля.

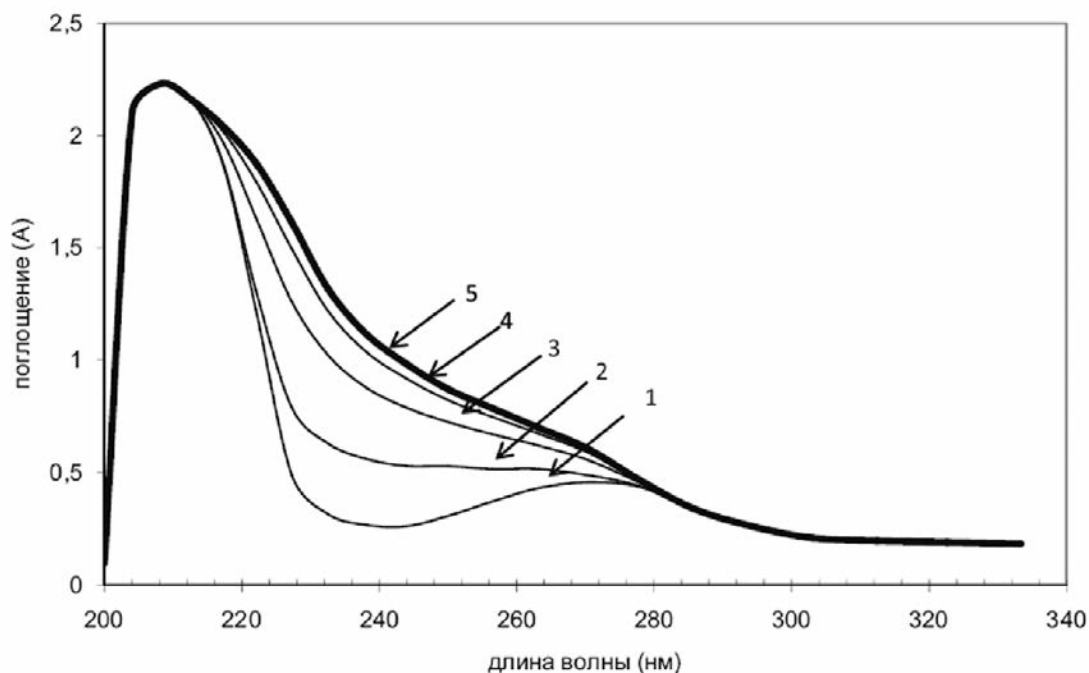


**Рисунок 2.**

Электрофоретическое разделение ТБЦ печени крыс, получавших сернокислую медь (1) и контрольных, не получавших сернокислую медь (2). Белки разделяли в градиентном ПААГ(7-24), а - электрофореграмма, б - денситограмма.



МСБ, выделенные из цитозоля печени контрольных животных, т.е. не получавших сернокислую медь, имеют две области максимума поглощения в УФ области, одна при 208 нм и вторая при 278 нм (рис. 3, кривая 1).



**Рисунок 3.**

Спектр поглощения в УФ-области МСБ, выделенных из печени контрольной группы животных при титровании сернокислой медью. Концентрация белка - 1 мг/мл, титровали сернокислой медью с шагом 12,5 мкг/мл. 1 - контроль, 2-4 инкубирование при концентрации сернокислой меди соответственно 12,5; 25 и 37,5 мкг/мл, 5 - спектр поглощения в состоянии насыщения при инкубировании с 50-100 мкг/мл сернокислой меди.

Процесс связывания ионов меди с МСБ сопровождался увеличением поглощения при 230 нм, но не при 278 нм (рис. 3). Необходимо отметить, что увеличение поглощения этими белками зависело от количества связавшихся ионов меди и этот процесс имел насыщающий характер (рис. 3).

В следующей серии экспериментов определяли ИК – спектры для МСБ, выделенных из цитозоля печени контрольных животных и животных, которым предварительно трижды вводили сернокислую медь по схеме 1+1+1 мг/100 г с интервалом 48 часов. Было обнаружено, что инфракрасные спектры МСБ, выделенных из цитозоля контрольных животных, были сходны с ИК-спектрами МСБ опытных животных (рис. 4). Однако между этими спектрами имелись различия в области  $2450\text{--}2300\text{ см}^{-1}$  и  $2100\text{--}1800\text{ см}^{-1}$  (рис. 4). Эти результаты могут свидетельствовать о конформационных изменениях МСБ после связывания ионов меди в системе *in vivo*, что указывает на наличие специфических систем связывания ионов меди у этих белков.

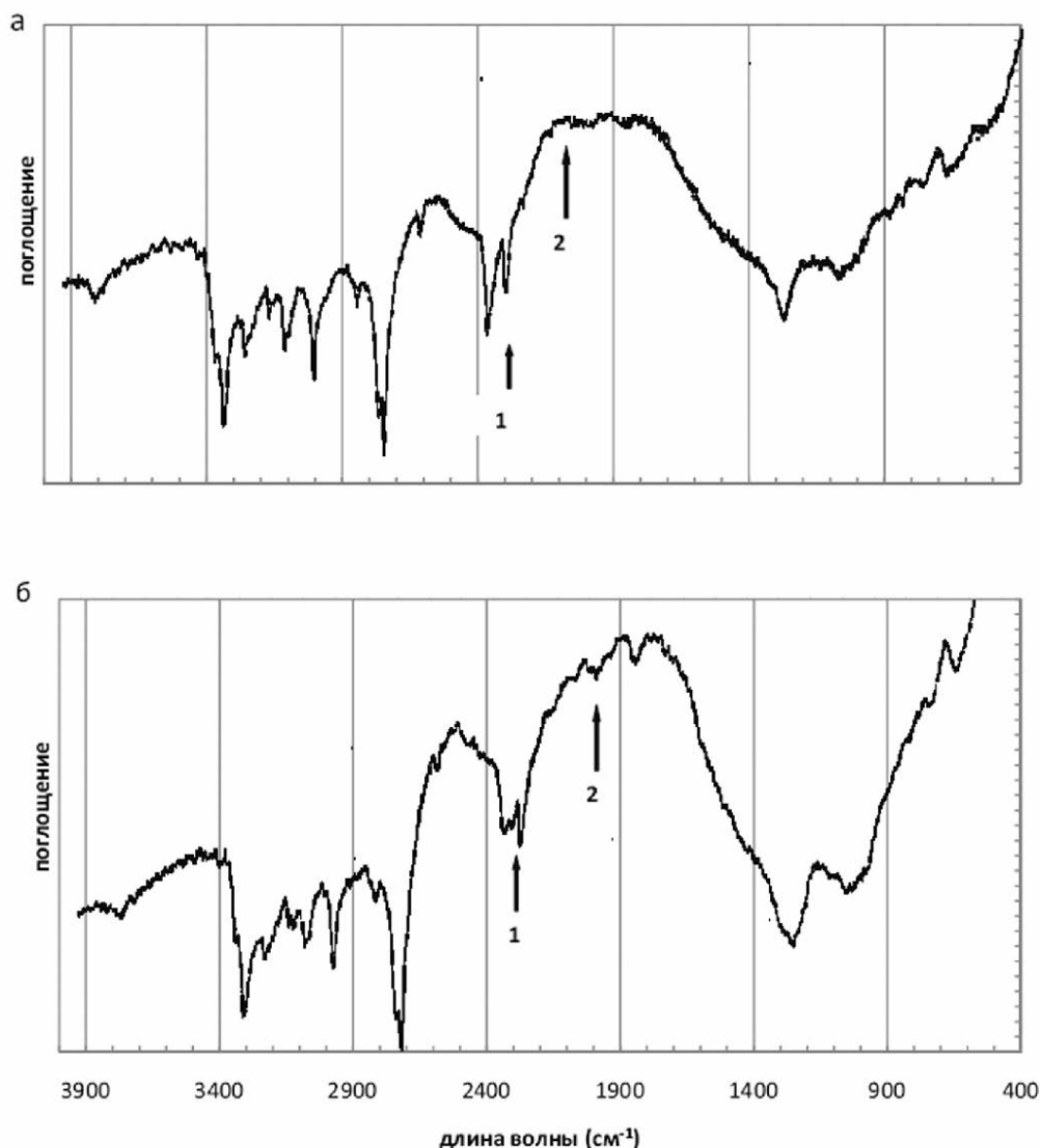


Рисунок 4.

Инфракрасные спектры МСБ, выделенных из цитозоля клеток печени контрольной группы животных (а) и животных, получавших сернокислую медь по схеме 1+1+1 мг/100 г (б). Для измерений использовали SPECORD 75IR, образцы измеряли в таблетках KBr с 1-2% исследуемого вещества. Диапазон измерений 4000-400 см<sup>-1</sup>. Стелками 1 и 2 показаны области с наибольшими изменениями после связывания меди.

Следовательно, среди белков цитозоля имеются белки, которые характеризуются высокой термостабильностью, имеют молекулярную массу 10-14 кДа и специфически связывают ионы меди, т.е. относящиеся к медьсвязывающим белкам.

Можно полагать, что эти МСБ принимают участие в депонировании и формировании внутриклеточного паттерна ионов меди и тем самым обеспечивают индуцированную устойчивость организма к высоким дозам сернокислой меди, что было показано ранее [8].

## ИМПРИНТИНГ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ МЕДИ

*Внутриклеточное распределение ионов меди.* В первой серии экспериментов определяли естественный (фоновый) характер распределения ионов меди между МСБ, цитозолем, микросомами и митохондриями печени 3 месячных крыс.

Было обнаружено, что у 3 месячных животных, находившихся на стандартном рационе вивария, с 1 мг МСБ было связано 0,733 мкг  $\text{Cu}^{2+}$ , что в 15 раз больше по сравнению с белком цитозоля, микросом и митохондрий, в которых содержится приблизительно одинаковое количество ионов меди ( $0,04 \pm 0,05$  мкг/мг) (табл. 2).

*Таблица 2.* Содержание ионов меди (мкг ионов  $\text{Cu}^{2+}$  /1мг белка) в ТБЦ, белках общей фракции цитозоля, микросомах и митохондриях клеток печени 3 месячных животных, находившихся на стандартном рационе вивария (контроль) и после однократного введения сернокислой меди 1 мг/100 г массы. Содержание ионов меди определяли через 24 ч после последнего введения.

<b>Схема введения</b>	<b>МСБ</b>	<b>цитозоль</b>	<b>микросомы</b>	<b>митохондрии</b>
<b>Контрольные животные</b>	<b>0,733±0,165</b>	<b>0,048±0,017</b>	<b>0,048±0,02</b>	<b>0,037±0,006</b>
<b>Однократное введение сернокислой меди, 1 мг/100 г</b>	<b>8,1±1,28</b>	<b>0,25±0,06</b>	<b>0,28±0,04</b>	<b>0,648±0,092</b>

Следовательно, наибольшее количество ионов меди в клетках печени контрольных животных было связано с МСБ, однако ионы меди выявлялись со всеми исследованными фракциями, что свидетельствует о гетерогенном характере распределения ионов меди в печени в норме.

В следующей серии экспериментов определяли характер распределения ионов меди по этим компонентам клетки в случае однократного введения животным сернокислой меди в количестве 1 мг/100 г массы тела, что составляет треть от летальной дозы этого вещества.

Было обнаружено, что спустя 24 часа после введения в организм сернокислой меди во фракции МСБ было выявлено до 8 мкг  $\text{Cu}^{2+}$ /1 г белка, т.е. в 12 раз больше, чем “фоновый” уровень. При этом количество меди в МСБ было в 32 раза больше по сравнению с белками цитозоля, в 28 раз больше по сравнению с микросомами и в 12 раз больше, чем в митохондриях (табл. 2).

Следовательно, если 3 месячным животным однократно вводили 1 мг  $\text{CuSO}_4$  на 100 г массы тела (при летальной дозе около 3 мг), то наибольшее ее количество среди анализируемых фракций связывали МСБ. В то же время микросомы, митохондрии и цитозоль связывали различные количества меди, т.е. имело место изменение внутриклеточного характера распределения ионов меди по сравнению с базовым уровнем и можно утверждать, что при такой дозе однократного введения сернокислой меди МСБ не “защищали” компоненты клетки от ионов меди.

Если полагать, что в формировании такого паттерна внутриклеточного распределения ионов меди, обеспечивающего устойчивость, принимают участие МСБ, то предварительная индукция этих белков может способствовать сохранению специфического паттерна внутриклеточного распределения и, как следствие, обеспечению устойчивости к ионам меди.



Для проверки этого было проведено несколько серий экспериментов, в которых животным вводили сернокислую медь в различных концентрациях, начиная с малых доз, при которых можно было ожидать индукцию синтеза МСБ.

В первой серии экспериментов животным последовательно с интервалом 2 сут вводили малые дозы последовательно 0,15; 0,3; 0,6 и 1 мг сернокислой меди на 100 г массы тела животного. Спустя 24 часа после последнего введения сернокислой меди у этих животных определяли количество ионов меди, специфически связанных с МСБ и с белками цитозоля, микросом и митохондрий.

Оказалось, что при введении сернокислой меди по этой схеме количество ионов меди, связанной с МСБ, увеличивается по сравнению с контрольными животными в 10 раз и составляло всего 6,168 мкг/1 мг белка (табл. 3). Однако при этом также увеличивалось содержание  $\text{Cu}^{2+}$ , связанного с белком фракций цитозоля, микросом и митохондрий по сравнению с контрольным уровнем. Так “нагруженность”  $\text{Cu}^{2+}$  белков цитозоля увеличивалось в сравнении с контрольным уровнем в 5 раз, микросом в 24 раза, а митохондрий в 14 раз. Разница между нагруженностью МСБ и другими фракциями изменилась по сравнению с интактным уровнем (табл. 3). Сформировался новый паттерн внутриклеточного распределения ионов меди, однако индукция МСБ малыми дозами (0,15–0,3) приводила к избирательному связыванию ионов меди с МСБ. Вместе с тем, необходимо отметить, что и в этом случае МСБ превосходили другие фракции печени по содержанию ионов меди в 22, 11 и 5 раз для цитозоля, микросом и митохондрий соответственно.

Таблица 3. Количество связанных ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (мкг  $\text{Cu}^{2+}$ /мг белка) с МСБ, белками цитозоля, микросом и митохондрий клеток печени 3-месячных крыс, которым вводили сернокислую медь по схеме 0,15+0,3+0,6+1, 0,15+0,3+0,6+2 и 1+1+1 мг/100 г. Содержание ионов меди определяли через 24 ч после последнего введения.

<b>Схема введения</b>	<b>МСБ</b>	<b>цитозоль</b>	<b>микросомы</b>	<b>митохондрии</b>
<b>0,15+0,3+0,6+1</b>	<b>6,17±3,24</b>	<b>0,27±0,15</b>	<b>0,55±0,4</b>	<b>1,16±1,26</b>
<b>0,15+0,3+0,6+2</b>	<b>12,04±3,82</b>	<b>1,32±1,55</b>	<b>1,32±0,31</b>	<b>1,19±0,34</b>
<b>1+1+1</b>	<b>5,34±3,33</b>	<b>0,42±0,25</b>	<b>1,09±0,28</b>	<b>0,84±0,47</b>

Можно полагать, что при введении такого количества ионов меди и по такой схеме МСБ достигают “насыщения” ионами меди и медь связывается с другими белками и субклеточными структурами, в частности с микросомами, т.е. изменяется паттерн связывания, характерный для контроля. Для проверки этого предположения в следующей серии экспериментов животным вводили сернокислую медь по схеме 0,15+0,3+0,6+2 мг/100 г, т.е. в 2 раза увеличивали дозу сернокислой меди при последнем введении. Если МСБ при использовании схемы введения 0,15+0,3+0,6+1 мг/100 г достигали насыщения, то можно ожидать, что они будут связывать такое же количество ионов меди и в случае использования схемы 0,15+0,3+0,6+2 мг/100 г, а другие компартменты будут связывать ещё больше ионов меди.

## ИМПРИНТИНГ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ МЕДИ

Оказалось, что в этом случае МСБ связывали до 12 мкг  $\text{Cu}^{2+}$ /мг белка, т.е. в 2 раза больше по сравнению со схемой 0,15+0,3+0,6+1,0 (табл. 3).

При схеме введения 0,15+0,3+0,6+2,0 мг/100 г содержание ионов меди по сравнению с контролем увеличилось в МСБ в 20 раз, цитозоле в 27 раз, микросомах в 27 раз и митохондриях в 32 раза, при этом абсолютное содержание ионов  $\text{Cu}^{2+}$  на мг белка было одинаковым в микросомах, митохондриях и в цитозоле (табл. 3). Если содержание ионов меди в МСБ у контрольных животных было в 15 раз больше по сравнению с другими фракциями клетки, то при введении сернокислой меди по схеме 0,15+0,3+0,6+2,0 МСБ связывали только в 10 раз больше ионов меди по сравнению с другими фракциями. Однако МСБ во всех случаях связывали больше ионов меди, чем другие фракции.

Следовательно, увеличение количества связанных ионов меди с функционально важными компонентами клетки – микросомами и митохондриями – происходит даже тогда, когда МСБ потенциально способны связывать ионы меди, что позволяет сделать заключение, что формирование паттерна внутриклеточного распределения ионов меди определяется не только функцией специфических медьсвязывающих белков.

Исходя из полученных результатов можно заключить: 1) при схеме введения сернокислой меди 0,15+ 0,3+0,6+1 мг/100 г отсутствует насыщение МСБ ионами меди; 2) связывание ионов меди с фракциями микросом, митохондрий происходит не только после “насыщения” ионами меди МСБ; 3) паттерн внутриклеточного распределения ионов меди зависит не только от способности МСБ связывать ионы меди, схемы введения сернокислой меди, но, вероятно, и от не учтенных нами характеристик внутриклеточных структур.

Так как при этой схеме введения животные получают 3,05 мг/100 г сернокислой меди в результате четырех последовательных введений, а явной индукции малыми дозами степени связывания и количества МСБ не наблюдалось, в следующей серии экспериментов животным вводили те же 3 мг/100 г по схеме 1+1+1 мг/100 г массы тела с интервалом 2 суток между введениями.

Было обнаружено, что и в этом случае наибольшая нагруженность ионами меди была у МСБ (5,3 мкг/мг белка), они связывали в 12,7 раз больше меди по сравнению с белком цитозоля, в 6,3 раза больше митохондрий и в 5 раз больше микросом (табл. 3).

При сравнении трех исследуемых схем введения сернокислой меди можно заметить, что схема 1+1+1 даёт практически такой же характер внутриклеточного распределения, что и схема 0,15+0,3+0,6+1, хотя в этом случае животные получали суммарно меньшую дозу (2 мг/100 г по сравнению с 3 мг/100 г), т.е. в этом случае в большей степени сохранялась “специфичность” (различие) в нагруженности разных компартментов ионами меди в клетке по сравнению со схемой введения 0,15+0,3+0,6+2, когда белки цитозоля, микросом и митохондрий связывали одинаково большое количество ионов меди.

Ранее было показано, что введение сернокислой меди животным по схеме 1+1+1 обеспечивает устойчивость этих животных к летальным для них концентрациям при однократном введении [8].

Следовательно, многократные последовательные введения сернокислой меди в больших дозах приводят к наибольшему связыванию ионов меди с МСБ. МСБ не обеспечивают полной защиты функционально важных клеточных структур от ионов меди и это не определяется степенью насыщения МСБ ионами меди. Можно полагать, что такой внутриклеточный паттерн распределения ионов меди отражает кумулятивный эффект ионов меди при введении сернокислой меди с интервалом 24 часа.

В следующей серии экспериментов животным дважды вводили сернокислую медь с интервалом между введениями 1 месяц.

*Эффект длительного сохранения специфического паттерна внутриклеточного характера распределения ионов меди.* Для решения вопроса временного характера изменения внутриклеточного паттерна распределения ионов меди в клетках печени, что необходимо для понимания механизмов индуцированной резистентности, определяли содержание ионов меди в компартментах клетки не через 24 часа, а спустя 30 дней после последнего введения сернокислой меди по схеме 1+1+1.

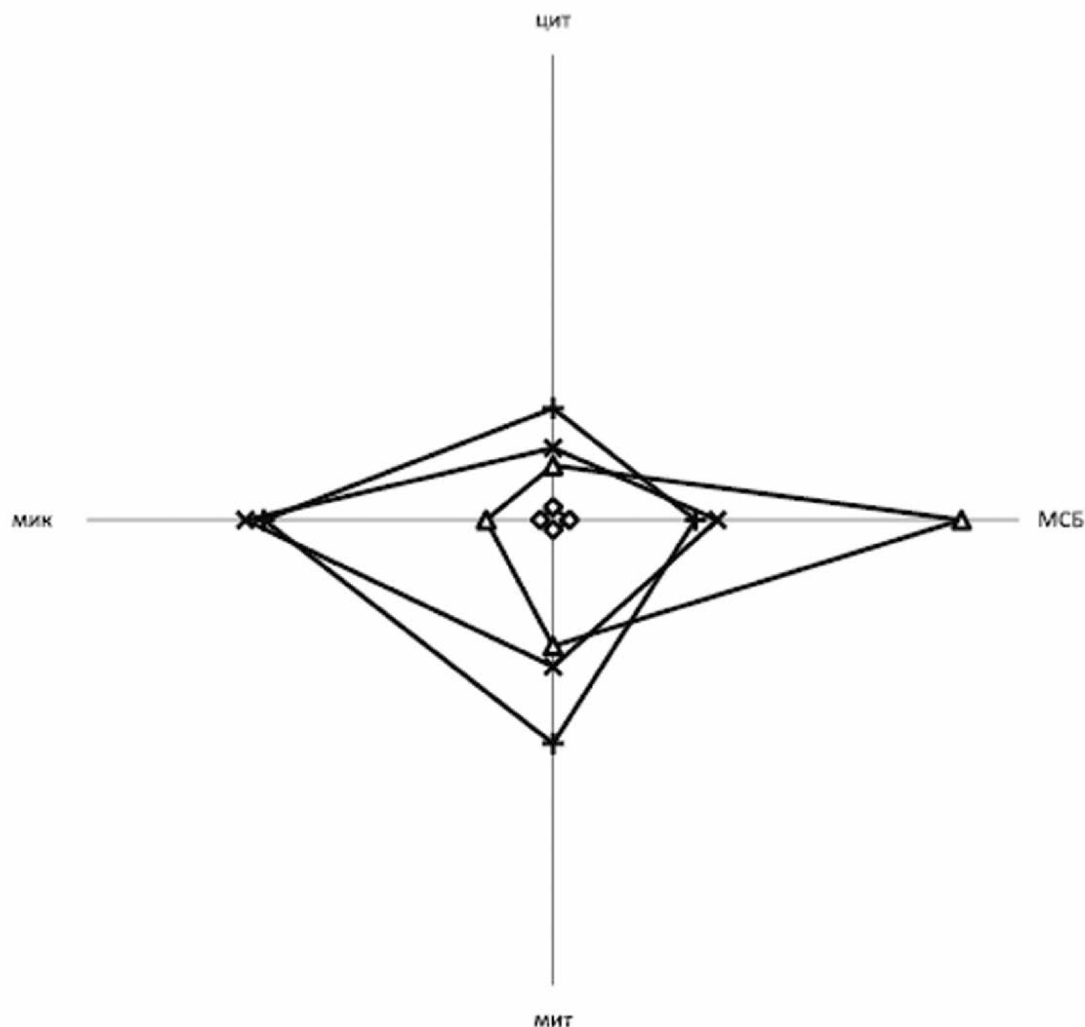
Было обнаружено, что спустя месяц содержание ионов меди не отличалось от паттерна внутриклеточного распределения базового уровня (контроля) (табл. 4). Из этого следует, что спустя 30 дней экзогенная медь полностью выводится из организма и восстанавливается базовый паттерн распределения ионов меди в клетках печени.

*Таблица 4.* Количество связанных ионов  $\text{Cu}^{2+}$  (мкг  $\text{Cu}^{2+}$ /мг белка) с МСБ, белками цитозоля, микросом и митохондрий клеток печени 3-месячных крыс, которым вводили сернокислую медь по схеме 1+1+1 мг/100 г. Содержание ионов меди определяли через 30 дней после последнего введения.

<b>Схема введения</b>	<b>МСБ</b>	<b>цитозоль</b>	<b>микросомы</b>	<b>митохондрии</b>
<b>Контрольная группа, базовый уровень</b>	<b>0,733±0,165</b>	<b>0,048±0,017</b>	<b>0,048±0,02</b>	<b>0,037±0,006</b>
<b>1+1+1</b>	<b>0,634±0,12</b>	<b>0,039±0,013</b>	<b>0,052±0,009</b>	<b>0,044±0,008</b>

В том случае, если животным вводили сернокислую медь по схеме 1+1+1, а спустя 1 месяц им вновь вводили сернокислую медь по той же схеме, то выявили совершенно иной характер внутриклеточного распределения ионов меди, который можно определить, как адаптивный паттерн. При этом МСБ связывали 15 мкг  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 г белка, что почти в 3 раза больше по сравнению с первым введением по схеме 1+1+1 мг/100 г. Необходимо отметить, что это наибольшее содержание ионов меди по сравнению со всеми другими схемами введения сернокислой меди. Однако, наиболее важно в адаптивном паттерне то, что при этом белки цитозоля, микросом и митохондрий, напротив, связывали значительно меньше в 2, 4 и 2 раза соответственно ионов меди по сравнению с первым введением сернокислой меди, т.е. действительно проявляется защитный эффект белков клетки путём их связывания с МСБ (рис. 5).

Если сравнить количество меди, связанной с разными фракциями клетки, то оказалось, что МСБ связывали в 74 раза больше меди по сравнению с белками цитозоля, в 32 раза больше по сравнению с митохондриями и в 60 раз больше по сравнению с микросомами при схеме введения 1+1+1 спустя 30 дней (рис. 5).



**Рисунок 5.**

Паттерн распределения ионов меди в клетках печени контрольных животных, не получавших сернокислую медь (◇), получавших медь по схеме 0,15+0,3+0,6+1 (×), 1+1+1 мг/100 г (+), и по схеме 1+1+1 и спустя месяц вновь 1+1+1 мг/100 г (△).

МСБ - медь связывающие белки, цит - цитозоль, мик - микросомы, мит - митохондрии (масштаб по оси МСБ уменьшен в 10 раз).

Следовательно, повторное введение сернокислой меди по схеме 1+1+1 мг/100 г спустя 1 месяц, которое сопровождалось полным выведением эндогенных ионов меди, приводило к формированию специфического адаптивного паттерна распределения ионов меди в клетках печени с преимущественной локализацией ионов меди в МСБ и проявлению выраженного защитного эффекта от ионов меди других клеточных структур.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Начиная с работ Ritossa и Kagi и др. известно, что такие стресс-факторы, как высокая температура, ионы тяжелых металлов и целый ряд химических соединений индуцируют синтез белков теплового шока, металлотионеинов и других стресс-белков [17, 18]. В настоящее время сформировались представления о роли этих белков в адаптивном ответе на экстремальные для организма факторы среды. Однако наряду со стресс-белками

ионы тяжелых металлов связываются с огромным количеством белков и других макромолекул в клетке. Известно, что распределение ионов металлов в клетке чрезвычайно гетерогенно и было высказано предположение о функционировании механизма последовательного дозо-зависимого связывания ионов металлов с компонентами клетки [3]. Исходя из этого можно полагать, что в интактных клетках организма наряду со стресс-белками существуют белки, обладающие различной связывающей способностью по отношению к экзогенным молекулам (ионам металлов), и эти белки формируют специфический внутриклеточный паттерн распределения ионов металлов, что в конечном итоге обеспечивает биологические эффекты действия металлов. Оценка биологического действия ионов металлов возможна только на основе знания закономерностей внутриклеточного паттерна их распределения. В настоящей работе проверяли гипотезу о наличии в клетках интактной печени белков, способных депонировать ионы металлов и определять паттерн их распределения в клетках печени.

Оказалось, что в клетках интактной печени крыс присутствуют белки, способные специфически связывать ионы меди, их количество достаточно велико и составляет до 15-20% от всех ТБЦ цитозоля. Эти белки, как и металлотионеины, могут быть отнесены к термостабильным белкам, они имеют молекулярную массу 10-14 кДа и способны связывать до 15 мкг ионов  $\text{Cu}^{2+}$  на 1 мг белка в системе *in vivo*. О специфичности связывания ионов меди этими белками свидетельствует следующее:

- содержание ионов меди в них может варьировать в десятки раз (в 74 раза, рис. 5);
- связывание ионов меди сопровождается конформационными изменениями этих белков (рис.3, 4);
- связывание ионов меди этими белками имело насыщающий характер (рис. 3);
- для этих белков характерен эффект импринтинга, который проявляется спустя 1 месяц после последнего введения, что указывает на постоянное фоновое присутствие этих белков в клетках печени (рис. 5).

Так как в течение месяца после введения сернокислой меди происходило полное восстановление исходного уровня распределения ионов меди в клетках печени, можно утверждать, что формирование импринтинга обеспечивается эпигенетическими механизмами.

Нет сомнений, МСБ играют важную роль в депонировании и внутриклеточном распределении ионов меди в клетках печени, однако особая роль им принадлежит в формировании импринтинга в специфическом внутриклеточном распределении ионов меди (рис. 5).

Тот факт, что при использовании различных схем введения сернокислой меди в организм 0,15+0,3+0,6+1 или 1+1+1 наблюдается значительное увеличение количества ионов меди, связывающихся с фракциями микросом, митохондрий и белков цитозоля, может объясняться частичным проявлением кумулятивного эффекта.

Механизм импринтинга может быть связан с тем, что МСБ представлены гетерогенными белками и в процессе длительных последовательных введений сернокислой меди индуцируется синтез фракций, обладающих наибольшей специфичностью к ионам меди. Или же, напротив, длительное последовательное введение сернокислой меди индуцирует эпигенетические изменения во внутриклеточном базовом распределении самих МСБ, за счет чего они впоследствии более эффективно связывают экзогенные ионы меди. Исследование механизмов импринтинга внутриклеточного распределения, обусловленное ролью МСБ, представляет большой интерес для понимания механизмов адаптации организма к ионам тяжелых металлов.

# ЛИТЕРАТУРА

1. *Linder M.C.* (1991) in: Biochemistry of Copper, Plenum Press, NY, pp. 1–13.
2. *O'Halloran T.V., Culotta V.C.* (2000) J. Biol. Chem., **275**, 25057–25060.
3. *Божков А.И.* (1997) Биохимия, **60**, 176–186.
4. *Божков А.И., Голтвянский А.В.* (1998) Альгология, **8**, 162–169.
5. *Божков А.И., Голтвянский А.В.* (2000) Альгология, **10**, 22–31.
6. *Puig S., Thiele D.J. Curr.* (2002) Opin. Chem. Biol., **6**, 171–180.
7. *Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V.* (1999) Science, **284**, 805–808.
8. *Божков А.И., Длубовская В.Л., Линник М.А., Шабани М., Белоус А.М.* (1998) Доповіді НАН України, **5**, 153–157.
9. *Changela A., Chen K., Xue Y., Holschen J., Outten C.E., O'Halloran T.V., Mondragon A.* (2003) Science, **301**, 1383–1387.
10. *Vulpe C.D., Packman S.* (1995) Ann. Rev. Nutrition, **15**, 293–322.
11. *Finney L.A., O'Halloran T.V.* (2003) Science, **300**, 931–936.
12. *Bremner I.* (1998) in: Manifestations of copper excess, **67**, pp. 1069S–1073.
13. *Божков А.И., Малеев В.А.* (2004) Успехи геронтологии, **13**, 58–65.
14. *Bozhkov A.I., Menzyanova N.G.* (1999) International Journal on Algae, **1**, 31–39.
15. *Laemli U.K.* (1970) Nature, **227**, 680–685.
16. *Tom-Petersen A., Hosbond C., Nybroe O.* (2001) FEMS Microbiol. Ecol., **38**, 59–67.
17. *Ritossa F.* (1962) Experimentia, **18**, pp. 571–573.
18. *Kagi J.H.R., Vallee B.L.* (1961) J. Biol. Chem., **236**, 2435–2442.

Поступила: 12. 06. 2008.

## APPEARANCE OF THE IMPRINTING EFFECT ON THE SPECIFIC PATTERN OF INTRACELLULAR DISTRIBUTION OF COPPER IONS IN THE LIVER AFTER EXPOSURE TO HIGH CONCENTRATIONS OF COPPER SULFATE

*A.I. Bozhkov<sup>1</sup>, V.I. Sidorov<sup>1</sup>, V.L. Dlubovskaya<sup>1</sup>, M.Ya. Shevtsova<sup>1</sup>, Yu.N. Surov<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Research Institute of Biology of V.N. Karazin Kharkov National University, sq. Svobody, 4, Kharkov, 61077 Ukraine; e-mail: bozhkov@univer.kharkov.ua

<sup>2</sup>Research Institute of Chemistry of V.N. Karazin Kharkov National University, sq. Svobody, 4, Kharkov, 61077 Ukraine

Fractions of copper-binding protein (CBP) specifically bound copper ions were extracted from the rat liver cell cytosole. These fractions of 10–14 kDa proteins are involved in specific pattern of intracellular distribution of copper ions. The imprinting effect of specific pattern of copper ions intracellular distribution has been found. The effect was detected 30 days after sequented injections of copper sulfate into the body. It was shown, that after primary injection of copper the ability of CBP to bind copper ions could increase tenfold, regardless of schemes of copper sulfate injection.

**Key words:** imprinting, intracellular localization, cooper ions, metallothioneins.