

## ВЛИЯНИЕ ИОНОВ СЕРЕБРА НА МЕТАБОЛИЗМ МЕДИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ТЕЧЕНИЕ РАЗВИТИЯ

© 2018 г. Е. Ю. Ильичева<sup>1,3,\*</sup>, Л. В. Пучкова<sup>1,2,3</sup>, М. М. Шавловский<sup>1</sup>,  
Д. Э. Коржевский<sup>1</sup>, Е. С. Петрова<sup>1</sup>, Н. В. Цымбаленко<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины

197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

19525, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

<sup>3</sup>Университет ИТМО

197101, Санкт-Петербург, Кронверкский проспект, д. 49

\*E mail: ilichevaey@gmail.com

Поступила в редакцию 17.10.2017 г.

Окончательный вариант получен 15.11.2017 г.

Проведено исследование метаболизма меди у лабораторных крыс, получавших с пищей ионы серебра (Ag-диета) с первого дня жизни в течение 5, 20, 40 и 180 дней. В сыворотке крови измерены показатели статуса меди и получены данные о распределении ионов серебра в организме. Проведен сравнительный гистологический анализ срезов головного мозга, печени, почек и селезенки взрослых крыс, получавших Ag-диету в течение месяца или полугодия. В клетках печени, как центрального органа, контролирующего метаболизм меди у млекопитающих, определены содержание меди и серебра, уровень экспрессии генов медь-транспортных белков, а также ферментативная активность купроэнзимов. Показано, что у взрослых крыс, получавших Ag-диету в течение месяца, показатели статуса меди падают почти до нуля. Напротив, у крыс, получавших с пищей серебро в течение полугодия с первого дня жизни, эти показатели снижаются только в 2 раза. При этом уровень экспрессии генов, контролирующих гомеостаз меди, снижается. Экспрессия генов, кодирующих купроэнзимы, не меняется. Ферментативная активность церулоплазмينا, основного медьсодержащего белка крови, снижается, активность клеточного купроэнзима СОД1 не меняется. В работе обсуждаются пути вмешательства серебра в метаболизм меди, и механизмы, компенсирующие это вмешательство. Данные могут помочь оценить последствия увеличения серебра в окружающей среде в связи с прогрессивным ростом использования наночастиц серебра во всех сферах деятельности человека.

*Ключевые слова:* медь, серебро, метаболизм меди, пищевое серебро как экологический фактор, животная модель

DOI: 10.7868/S0475145018030047

### ВВЕДЕНИЕ

Функционирование живых систем в различных условиях окружающей среды обеспечивается существованием потенциальных возможностей их адаптации. Это касается всех организмов, находящихся на различных уровнях эволюции. Метаболическая система меди (МСМ) млекопитающих сложилась под влиянием множества факторов и благодаря своей многокомпонентности составляющих, которые обеспечивают поступление, транспорт, распределение, рециклизацию и выведение ионов меди (Prohaska, Gybina, 2004), представляет собой интерес с точки зрения исследования возможностей альтернативных механизмов функционирования в разных условиях, например, при увеличении поступления ионов серебра. Серебро

обоснованно можно отнести к экологическим факторам, т.к. в последние десятилетия резко возросло содержание серебра в пище (потребление “серебряной” воды, дезинфекция питьевой воды, применение серебра для обеззараживания плавательных бассейнов и др.). К тому же наночастицы серебра широко используются для изготовления одежды с противогрибковыми свойствами, применяются в медицине для дезинфекции и обработки ожогов и ран, рассматриваются как перспективное терапевтическое средство против HIV-1 и опухолей (Elechiguerra et al., 2005; Liu et al., 2008; Medvetz et al., 2008; Payne, Ambrosio, 2009; Lansdown, 2010).

Медь является важнейшим микроэлементом для всех организмов, которые имеют окислительный метаболизм. Вместе с железом и цинком она входит

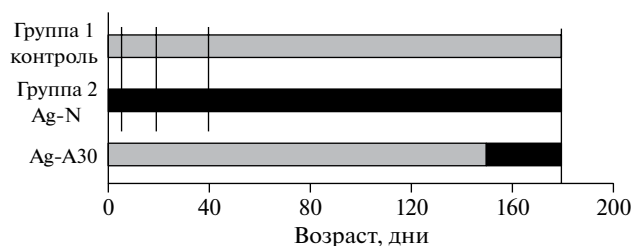
в тройку наиболее распространенных важных для млекопитающих переходных металлов (Lewinska-Preis et al., 2011). Медь задействована в клеточном сигналинге, а также является структурным и функциональным кофактором ключевых жизненно важных ферментов, обеспечивающих рост и развитие организмов (Hordujewska et al., 2014). В то же время ионы меди при переходах  $\text{Cu(I)} \leftrightarrow \text{Cu(II)}$  способствуют образованию активных метаболитов кислорода, которые обладают эффектом ионизирующего излучения (Armendariz et al., 2004). Дефицит и избыток меди в организме приводит к нарушению ее гомеостаза, что у человека становится причиной развития сердечнососудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Система, контролирующая гомеостаз меди млекопитающих (МСМ), высоко консервативна, включает интегральные мембранные и растворимые белки, которые транспортируют медь в состоянии  $\text{Cu(I)}$  (Gupta, Lutsenko, 2009; Vanci et al., 2010). МСМ органо- и тканеспецифична и изменяется в течение онтогенеза (Пучкова, Платонова, 2003; Платонова и др., 2005; Пучкова, 2015). В поддержании гомеостаза меди в целом организме ключевую роль играет печень. В зависимости от периода развития млекопитающих различают два типа поддержания баланса меди, которые определяются как эмбриональный и взрослый типы метаболизма меди (Hurley et al., 1980; Платонова и др., 2004; Zatulovskaia et al., 2015).

$\text{Ag(I)}$  изоэлектронен  $\text{Cu(I)}$ , поэтому он связывается транспортерами меди, снижая ее биодоступность (Petris et al., 2003; Choi et al., 2006), и встраивается в активные центры купроэнзимов, вызывая их инактивацию отчасти из-за того, что  $\text{Ag(I)}$ , в отличие от  $\text{Cu(I)}$ , не может быть окислен в водных системах (Скворцов и др., 2010; Пучкова et al., 2011; Wilcohen et al., 2011). Экспериментальный дефицит меди в течение беременности вызывает у плодов множественные нарушения в развитии (Shavlovski et al., 1995), а у родившихся животных – отдаленные нарушения в деятельности центральной нервной системы (Penland, Prohaska, 2004). Ранее нами было показано, что у взрослых крыс, содержащихся на  $\text{Ag}$ -диете в течение 30 дней,  $\text{Ag}$  всасывается в кишечнике, доставляется в печень, где встраивается в ключевой белок метаболизма меди церулоплазмин (ЦП), нарушая его третичную структуру и ферментативные функции: оксидазная активность в сыворотке крови падает до нуля (Клотченко и др., 2008; Ильичева и др., 2012; Пучкова et al., 2014). Самки таких животных не дают потомства. Однако, у крыс, с момента рождения получающих  $\text{Ag}$ -корм в течение 180 дней, оксидазная активность и концентрация меди в сыворотке крови снижены только в 2 раза, концентрация иммунореактивного ЦП не изменяется,

а в печени снижается транскрипционная активность генов белков метаболизма меди и сопряженных с ним белков обмена железа. Крысы этой группы производят здоровое потомство. Показано, что у них в кровотоке циркулируют 2 изоформы ЦП, отличающиеся третичной структурой и уровнем гликозилирования. Одна из этих изоформ секретруется не клетками печени (Пучкова et al., 2014; Пучкова et al., 2017). Остается неизвестно: на каком этапе постнатального развития в метаболизме крыс, выросших на  $\text{Ag}$ -диете, происходят перечисленные выше изменения. Чтобы ответить на этот вопрос были предприняты исследования, результаты которых представлены в данной работе. На фоне  $\text{Ag}$ -индуцированного дефицита меди у крыс с эмбриональным и взрослым типами метаболизма меди определены количественные параметры статуса меди в сыворотке крови: концентрация меди, содержание иммунореактивного ЦП и оксидазная активность (Harvey et al., 2009), исследовано распределение ионов  $\text{Cu(I)}$  и  $\text{Ag(I)}$  по внутренним органам, а также изучена активность генов, ассоциированных с метаболизмом меди в печени. Полученные данные помогут оценить влияние хронической длительной пищевой экспансии серебра на гомеостаз меди млекопитающих.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Экспериментальные животные.** Работа выполнена на потомстве белых беспородных крыс, полученном в виварии ФГБНУ “ИЭМ” от крыс из питомника “Рапполово” Ленинградской области. В помещении поддерживалась температура около  $25^\circ\text{C}$ , влажность около 60%, световой режим сменялся автоматически каждые 12 часов. Все животные получали корм и водопроводную воду без ограничения. Содержание меди в рационе контрольных и опытных групп оставалось стандартным. С первого дня жизни крыс разделили на две группы. Группу 1 составили контрольные крысы. Группу 2 – крысы, вскормленные самками, которые с первого дня лактации получали с кормом  $\text{AgCl}$  ( $\text{Ag}$ -самки), а с 23-го дня жизни в течение 6-ти месяцев продолжавшие получать корм, содержащий  $\text{AgCl}$ . Содержание  $\text{AgCl}$  в корме составляло 50 мг на 1 кг массы тела животных в сутки. Животные, получавшие с пищей  $\text{AgCl}$  с момента рождения в течение 5, 20, 40 и 180 дней жизни, обозначены соответственно:  $\text{Ag-5}$ ,  $\text{Ag-20}$ ,  $\text{Ag-40}$  и  $\text{Ag-180}$  крысы. Кроме того, в рассмотрение были взяты взрослые животные, получавшие с пищей  $\text{AgCl}$  в течение 30 дней, обозначенные  $\text{Ag-A30}$  крысы ( $\text{A}$  – adult) (рис. 1). В качестве контроля были использованы интактные животные из референсных групп. Животных умерщвляли путем смещения шейных позвонков, кровь собирали из шейных сосудов и извлекали органы. Сыворотку крови отбирали после



**Рис. 1.** Группы животных, использованных в работе. — стандартная диета; ■ — Ag-диета. Вертикальные линии показывают возраст крыс, вовлеченных в опыты: 5, 20, 40, 180 дней.

образования сгустка центрифугированием при  $2000 \times g$  10 минут. Биологические образцы хранили при  $-80^\circ\text{C}$ . Все манипуляции с животными, включая уход за ними, осуществляли в соответствии с действующими утвержденными правилами РФ (Министерство здравоохранения РФ, Приказ № 267, от 19 июня 2003 года; “Руководство по использованию лабораторных животных, Москва, 2005”). Исследования были одобрены комитетом по этике при Институте экспериментальной медицины (протокол № 2/13 от 27 июня 2013 года, ул. Академика Павлова, д. 12, Санкт-Петербург, 197376 Россия).

**Приготовление корма для Ag-диеты.** Животные экспериментальных групп получали стандартный корм с добавкой ионов серебра (Ag-корм) в форме AgCl в среднем 50 мг на кг массы тела в день (Puechova et al., 2011). Введение ионов серебра с кормом в виде AgCl имеет некоторые преимущества по сравнению с внутрибрюшинным введением в виде AgNO<sub>3</sub> (Prybil et al., 1982). При использовании раствора AgNO<sub>3</sub> в желудке образуется AgCl и токсичные ионы NO<sub>3</sub>(-). Несмотря на низкую растворимость AgCl в воде, в желудочно-кишечном тракте ионы серебра, легко мобилизуются из AgCl, координирующими серебро маленькими молекулами, например, аминокислотами. Разработанный и применяемый нами метод введения с пищей серебра в виде соли AgCl является физиологичным, поскольку ионы Ag, абсорбируются в кишечнике, поступают в клетки печени и включаются в ЦП (Zatulovsky et al., 2012; Puechova et al., 2014). Расчет Ag-добавки производили, исходя из того, что крыса (250 г массы тела) потребляет около 30 г сухого корма в день, поэтому на каждый 1 кг корма добавляли 330 мг AgCl. Корм тщательно перемешивали и увлажняли дистиллированной водой (~1:1 вес/объем). Для контроля равномерности распределения серебра определяли его концентрацию в ~100 мг случайных образцов, взятых из Ag-кормов. Средняя концентрация серебра была  $1600 \pm \pm 160$  мкг/л ( $n = 4$ ). Согласно стандартному отклонению, в корме, используемом для вскармливания

животных экспериментальных групп, серебро было распределено довольно равномерно. Поэтому можно считать, что ежедневное потребление серебра было регулярным. В стандартном корме, содержание меди составило 12,5 мг/кг. Таким образом, в Ag-корме молярное отношение Ag/Cu равнялось ~15.

**Получение субклеточных фракций печени крыс.** Субклеточные фракции выделяли методом дифференциального центрифугирования. Образцы печени гомогенизировали на льду с помощью дезинтегратора T10 basic ULTRA-TURRAX® (IKA, Германия) в буфере, содержащем 0.25 М сахарозу, 20 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ DTT, ингибиторы протеаз (буфер А). Для получения фракции митохондрий гомогенат последовательно центрифугировали 2 раза по 8 мин  $800 \times g$  и 20 мин  $12000 \times g$  на центрифуге Microfuge® 22R (BeckmanCoulter, США). Полученный осадок ресуспендировали в буфере А и инкубировали с 1% раствором “Triton X-100” в течение 20 минут на льду, после чего центрифугировали при  $18000 \times g$  в течение 10 минут на той же центрифуге. Для выделения цитозоля постмитохондриальный супернатант центрифугировали при  $18000 \times g$  в течение 1 часа. Концентрацию белка в полученных клеточных фракциях измеряли методом Брэдфорда (Bradford, 1976).

**Определение активности ферментов.** Оксидазную и феррооксидазную активности ЦП определяли окрашиванием в геле после фракционирования в нем белков сыворотки крови *o*-дианизидином и ферроцином соответственно (Owen, Smith, 1961; Chen et al., 2004). Электрофорез проводили в 8% полиакриламидном геле (ПААГ) в неденатурирующих условиях. Для выявления ферментативной активности SOD1 в цитозоле печени крыс гель после нативного электрофореза инкубировали 15 минут в 0.1% растворе Nitro blue tetrazolium (NBT), приготовленном на 100 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7.0. Затем гель отмывали водой и 15 минут инкубировали в темноте в 100 мМ калий-фосфатном буфере с добавлением 0,001% TEMED и 0.1% рибофлавина с последующим отмыванием водой. Просмотр геля осуществляли с помощью УФ-транслюминатора в течение 5–10 минут до появления полос белого цвета, соответствующих активности супероксид-дисмутазы (Vives-Vauza et al., 2007). Активность SOD3 в сыворотке крови измеряли спектрофотометрически, определяя степень торможения реакции окисления кверцетина (Костюк и др., 1990). Аутоокисление кверцетина проводили при комнатной температуре в 0.015 М фосфатном буфере (pH 7.8), содержащем 0.08 мМ ЭДТА и 0.8 мМ TEMED в конечном объеме 3.5 мл. Образцы сыворотки крови, разведенные в 1000 раз, вносили в объеме 0,1 мл. Реакцию начинали

добавлением в среду инкубации 1,4 мкМ кверцетина в 0,1 мл ДМСО. Оптическую плотность измеряли при длине волны 406 нм сразу после добавления кверцетина и через 20 минут прохождения реакции. Концентрацию SOD3 определяли по калибровочному графику зависимости степени ингибирования реакции аутоокисления кверцетина от концентрации фермента.

**Иммуноблоттинг.** Для проведения иммуноблоттинга белки, разделенные электрофоретически в 8, 10 или 12% ПААГ в нативных условиях или в присутствии SDS переносили на нитроцеллюлозную мембрану Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare, США) в камере для переноса белков контролировали окрашиванием мембран раствором Ponceau S. Для “забивки” мембраны использовали 5% раствор белков обезжиренного молока, приготовленный на PBS и содержащий 0,1% Tween 20. Для выявления ЦП крысы использовали кроличьи специфические поликлональные антитела к ЦП крысы, полученные методом, разработанным нами (Gaitskhoki et al., 1981). Содержание COMMD1 и металлотионеина выявляли с помощью коммерческих антител Santa Cruz Biotechnology (США). Для выявления SOD1 и COX использовали антитела Abcam (Великобритания). В качестве вторых антител использовали антикроличьи козы или антикозы ослиные иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания; Santa Cruz Biotechnology, США). Иммуные комплексы визуализировали хемилюминесцентным методом с помощью набора Amersham ECL Western Blotting System (GE Healthcare, США).

**Иммуноэлектрофорез.** Количественное содержание ЦП определяли методом ракетного иммуноэлектрофореза в 1% агарозном геле как описано ранее (Zatulovskiy et al., 2012). После электрофореза гель высушивали и окрашивали о-дианизидином.

**Выделение тотальной клеточной РНК, обратная транскрипция (ОТ), полимеразная цепная реакция (ПЦР) и полуколичественный метод определения уровня специфических мРНК.** Тотальную РНК выделяли с использованием коммерческого реагента TRIZOL (Ambion, “Thermo Scientific”, США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию РНК в препаратах измеряли на спектрофотометре “NanoDrop 2000” (“Thermo Scientific”, США). Степень очистки РНК от белков оценивали по отношению значений оптической плотности A260/A280. Нативность РНК в образцах контролировали методом электрофореза в 1,4% агарозном геле с бромистым этидием по соотношению 16S/28S РНК. Реакцию ОТ и ПЦР (состав инкубационных проб, температурный и хронометрический профили осуществляли, как описано ранее

(Plyechova et al., 2014). Транскрипционную активность генов взятых в рассмотрение белков метаболической системы меди оценивали полуколичественным методом, используя соотношение между квазистационарным уровнем мРНК данного гена и мРНК β-актина, который экспрессируется во всех тканях и органах организма так, что доля его мРНК от тотальной мРНК примерно одинакова (Magone et al., 2001). Дизайн специфических праймеров осуществляли с помощью программы Primer-BLAST (NCBI, США) (табл. 1). ПЦР-продукты, полученные с помощью специфических праймеров, фракционировали в 1,4% агарозном геле с EtBr и анализировали с помощью программы Image J. Относительный уровень специфических мРНК определяли по содержанию мРНК β-актина. Каждое значение получали трижды в независимых повторях ПЦР на кДНК, получаемых на образцах РНК, выделенных из трех животных в независимых экспериментах.

**Подготовка гистологических срезов органов крыс для морфологических исследований.** Для проведения морфологических исследований материал фиксировали цинк-этанол-формальдегидом (Коржевский, Гиляров, 2006) с последовательной заливкой парафином. Полученные препараты мозга, печени, почек и селезенки окрашивали гематоксилином и эозином, эозином (на эозинофильные гранулоциты), толуидиновым синим, по Перлсу на железо (III). Верификацию присутствия в составе пигментных отложений серебра проводили при помощи последовательной обработки срезов растворами йода и тиосульфата натрия.

**Определение лейкоцитарной формулы крови крыс.** Для определения лейкоцитарной формулы на предметное стекло наносили мазки крови из хвоста животных, высушивали их на воздухе и маркировали. Для фиксации мазков использовали раствор эозин-метиленового синего по Маю–Грюнвальду. Фиксированные мазки высушивали и окрашивали азур-эозином по Романовскому. Количество форменных элементов подсчитывали в иммерсионной системе с использованием механического счетчика (Меньшиков, 1987).

**Измерение концентрации гемоглобина в крови крыс.** Концентрацию гемоглобина измеряли с помощью коммерческого набора Hemoglobin (ELI Tech Group, Франция) в соответствии с протоколом производителя. Свежую цельную кровь с ЭДТА добавляли к реактиву Драбкина (0,6 мМ калия феррицианид, 0,76 мМ калия цианид, 1 мМ монофосфат калия), входящему в состав набора, в соотношении 1:250. В ходе двух последовательных реакций гемоглобин превращался в метгемоглобин, а затем в цианометгемоглобин. Оптическую плотность, характеризующую концентрацию цианометгемоглобина, определяли при длине

**Таблица 1.** Информация о праймерах, использованных в работе

№ п/п	Тривиальное название гена и его номер по базе NCBI	Положение	T <sub>отж</sub> (°C)	Нуклеотидная последовательность	Продукт, н.п.
1.	β-actin, NM_031144	прям.	59	gaagatcctgaccgagcgtg	327
		обрат.	59	agcactgtgttgca tag ag	
2.	Cp, NM_012532.2	прям.	57	aga taa caa aga ca cga gga att c	398
		обрат.	57	ctccttggtaga tat ttggaataa a	
3.	GPI-Cp, NM_001270961.1	прям.	57	aga taa caa aga ca cga gga att c	436
		обрат.	57	tcg tat tcc act taccacaattt a	
4.	Ctr1, NM_133600.1	прям.	57	tgctatgaccttct act ttg g	358
		обрат.	57	atgaagatgagcatgaggaag t	
5.	Ctr2, NM_001033693.2	прям.	60	gag gct gtg ctctcttt gat t	203
		обрат.	60	gag cctgtagaatcctggct g	
6.	Atp7a, NM_052803.2	прям.	64	gaagcc tac ttt ccc ggc tac aacagaagc	421
		обрат.	64	agg tac ccaaggtt cag tgtccagct cc	
7.	Atp7b, NM_012511.2	прям.	65	cag aag tac ttctagccctagcaag c	332
		обрат.	65	ccc acc aca gccagaaccttctg ag	
8.	Sod1, NM_017050.1	прям.	62	aca atacacaaggctctaccactg cag g	220
		обрат.	62	tcactgtttctcgtggaccaccata g	
9.	Sod2 NM_000636	прям.	62	tcctgacctgccttacgactatg g	285
		обрат.	62	gcttgatagcctccagcaactctc c	
10.	Cox4i1, NM_017202.1	прям.	60	aagagagccatttct act tcg gtg tg	484
		обрат.	60	cag gctctc act tcttcatt cat tc	
11.	Ccs, NM_053425.1	прям.	60	cag tctggtgttgatgagggaga ag	265
		обрат.	60	act gaataacctgacaggagctctg	
12.	Commd1, NM_001115022.1	прям.	60	gag gggaattctcaagtc tat tgc	307
		обрат.	60	ctcagattcccgtcc act tct c	
13.	Mt1a, NM_138826.4	прям.	58	cgactgcttctgtcgcttacac c	350
		обрат.	58	tca cat gctcgg tag aaaacgggg	

волны 540 нм, концентрацию гемоглобина вычисляли по калибровочному графику стандартов цианометгемоглобина.

**Измерение концентрации металлов.** Концентрацию металлов измеряли методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией и Зеемановской коррекцией неселективного поглощения на спектрометре “ZEE nit 650P” (Analytik Jena, Германия). Образцы тканей взвешивали и растворяли в концентрированной HNO<sub>3</sub>. Все образцы были приготовлены на деионизованной воде, обработанной смолой Chelex-100.

**Статистическая обработка данных.** Для обработки результатов исследования использовали статистический пакет SPSS9.0 (IBM, США). На столбчатых диаграммах данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием дисперсионного анализа с последующим применением posthoc критерия Стьюдента

с поправкой Бонферрони для сравнения трех, и более экспериментальных групп, и t-критерия Стьюдента для сравнения двух групп. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные, не удовлетворяющие критериям нормального распределения и не прошедшие тест на равенство дисперсий, обрабатывали с применением теста Краскала-Уоллиса. Значимыми принимали значения при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Эффекты хронической Ag-диеты в онтогенезе крыс.** Исследовали 5-дневных (эмбриональный тип метаболизма меди), 20-, 40- и 180-дневных (взрослый тип метаболизма меди) контрольных и Ag-крыс. В ходе постнатального развития крысы обеих групп существенно не отличаются по весу (табл. 2), а также по показателям физического развития. У контрольных крыс к 40-му дню жизни концентрация меди в сыворотке крови достигает

Таблица 2. Влияние Ag-диеты на некоторые физиологические и биохимические показатели у Ag-крыс

Показатели	Группы животных*											
	5 дней		20 дней		40 дней		180 дней		40 дней		180 дней	
	Контроль	Ag-крысы	Контроль	Ag-крысы	Контроль	Ag-крысы	Контроль	Ag-крысы	Контроль	Ag-крысы	Контроль	Ag-крысы
Вес, г	11.6±2,1	10.4±0,8	34.0±5,1	34.8±5,1	120.8±16,9	120.6±10,8	354.3±107,6	334.6±66,1				
[Cu] в сыворотке, мкг/л	51±41	539±60	582±117	558±109	1359±111	729±343	1306±100	981±28				
[Ag] в сыворотке, мкг/л	1.1±0.1	48.4±9.2	1.4±0.1	104.9±71.8	2.46±0.2	682.0±7.4	2.71±0.3	1580±240				
[Cu] в печени, мкг/г сырого веса	15.9±2.0	40.6±5.0	9.5±2.0	8.9±1.8	2.5±0.3	3.42±0.4	3.1±1.0	4.6±0.6				
[Ag] в печени, мкг/г сырого веса	1.03±0.3	8.2±2.0	1.1±0.1	11.9±0.3	0.5±0.01	6.5±1.9	0.5±0.1	75.5±1.00				
[Cu] в мозге, мкг/г сырого веса	1.07±0.21	0.91±0.18	1.40±0.21	1.34±0.24	1.46±0.10	1.34±0.09	1.74±0.2	1.8±0.3				
[Ag] в мозге, мкг/г сырого веса	0.56±0.19	0.77±0.15	0.85±0.06	2.38±0.46	0.48±0.01	4.10±0.48	0.5±0.2	8.9±1.6				
**[ЩП] белок, мг/мл	0.2±0.1	0.2±0.06	0.4±0.07	0.3±0.06	0.4±0.04	0.4±0.11	0.6±0.1	0.6±0.1				
***Оксидазная активность, у.е.	1.8±0.7	1.7±0.1	3.2±0.9	3.1±1.0	6.5±0.7	4.1±0.5	14.8±0.2	7.3±0.6				
***Ферроксидная активность, у.е.	0.3±0,1	0.3±0.03	0.3±0.1	0.4±0.05	0.5±0.03	0.2±0.04	0.7±0.2	0.5±0.1				

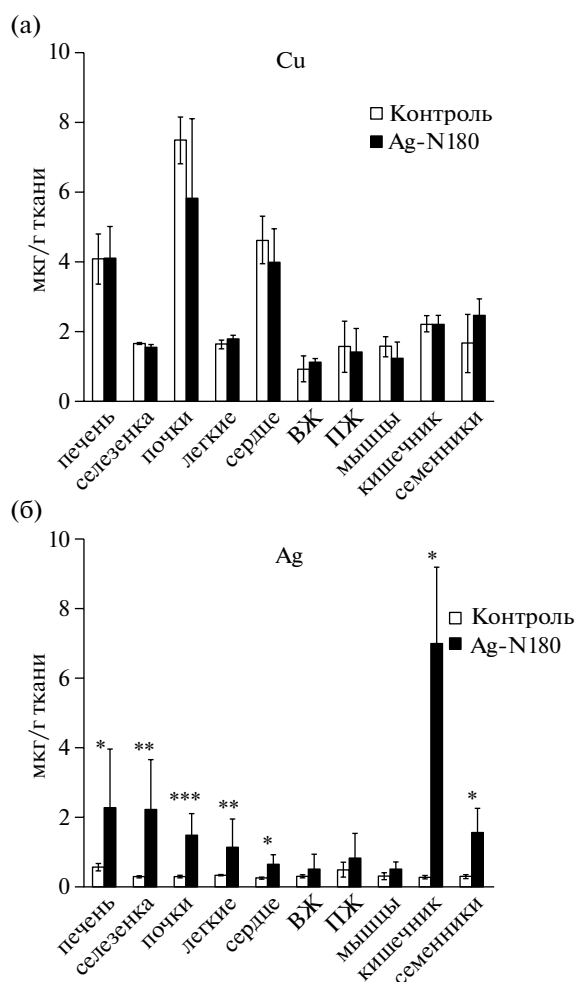
\* – каждая группа состояла из 5–10 животных; \*\* – определено методом ракетного иммуноэлектрофореза; \*\*\* – колориметрическое измерение в геле

значений, характерных для взрослых (180-дневных) животных, что примерно в 2,5 раза превышает аналогичные показатели у 5- и 20-дневных крыс (табл. 2). При этом в течение всего эксперимента в сыворотке крови Ag-крыс растет концентрация серебра (табл. 2).

У экспериментальных новорожденных крыс, как и у взрослых (Клотченко и др., 2008), серебро аккумулируется преимущественно в печени и в незначительных количествах обнаруживается в мозге (табл. 2). При этом существенных изменений в концентрации меди в органах Ag-крыс не выявлено. В течение первых дней развития, когда метаболизм меди характеризуется как эмбриональный, в печени как контрольных, так и Ag-крыс, концентрация меди растет и после перехода на взрослый тип метаболизма меди резко падает. В мозге концентрация меди растет примерно до половозрелого возраста и одинакова у животных обеих групп. Накопление серебра не приводит к дефициту меди в печени и мозге. В то же время, в сыворотке крови Ag-крыс к сороковому дню жизни происходит видимое снижение, по отношению к соответствующим значениям у контрольных животных, оксидантной и ферроксидантной активностей (табл. 2). Оксидантная активность, важный показатель статуса меди, у 5- и 20-дневных контрольных и Ag-крыс не изменяется, у 40-дневных контрольных крыс в 1,5 раза выше, чем у их ровесников, содержащихся на Ag-диете а у 180-дневных контрольных животных – в 2 раза выше.

Концентрация меди у Ag-180 крыс практически не отличается от таковой у контрольных животных (рис. 2а). Самая высокая концентрация меди найдена в печени, почках и сердце. В остальных взятых в рассмотрение органах концентрация меди ниже. Распределение серебра по органам у Ag-180 крыс неоднородно (рис. 2б). Наибольшие количества серебра были обнаружены в клетках кишечника, которые в экспериментах действуют в качестве барьера между Ag-пищей, и внутренней средой организма. Заметное количество серебра накапливается в печени, селезенке и легких, а в мышечной и жировой (внутренний и подкожный жир) тканях накопление серебра незначительно.

**Эффект длительности Ag-диеты на метаболизм меди у взрослых крыс.** Данные, полученные на крысах, которые получали с пищей серебро в течение полугодия (Ag-180 крысы), на крысах, получавших Ag-корм в течение 30 дней с 5-го по 6-й месяцы жизни (Ag-A30 крысы) и контрольных животных приведены в таблице 3. Содержание меди в сыворотке крыс обеих экспериментальных групп по сравнению с контрольными животными снизилось, у Ag-A30 почти в 10 раз, а у Ag-180 в 1.3 раза. Концентрация серебра в крови крыс группы Ag-180 почти в 2 раза превышает ее значение у Ag-A30



**Рис. 2.** Распределение меди (а) и серебра (б) в организме контрольных и Ag-180 крыс. Абсцисса – органы, взятые в рассмотрение, ордината – концентрация металлов (мкг/г ткани); \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,005$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ .

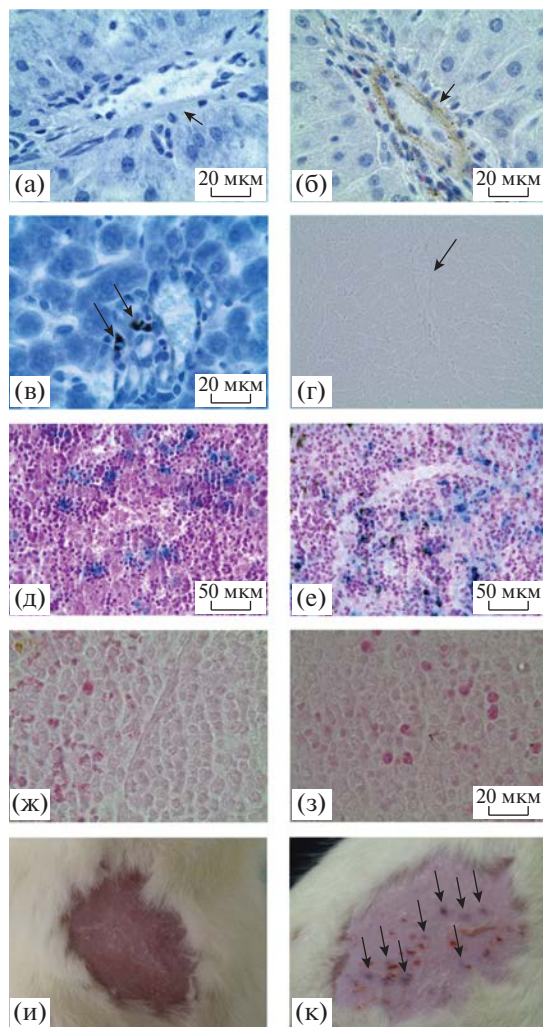
животных. По данным иммуноэлектрофореза уровень иммунореактивных полипептидов ЦП в крови контрольных и обеих экспериментальных группах животных, Ag-A30 и Ag-180, не изменяется (табл. 3). В то же время, показатели оксидазной и ферроксидазной активностей ЦП в сыворотке крови Ag-180 крыс в два раза ниже, чем у контрольных, а у Ag-A30 крыс обе активности практически исчезают (табл. 3). Репродуктивная функция у Ag-180 крыс проявляется в том же возрасте, что и в контрольной группе животных (60–70 дней жизни). Они производят жизнеспособное потомство. Крысы группы Ag-A30 потомства не дают. Количество новорожденных в помете у Ag-180 крыс снижено, по сравнению с контрольной группой, почти в 2 раза, однако, их потомство проявило высокую жизнеспособность (табл. 3) и, находясь на Ag-диете во втором поколении, оставалось репродуктивным (данные не приводятся).

Сравнительный анализ гистологических срезов головного мозга, печени, почек и селезенки выявил дополнительные различия между Ag-A30 и Ag-180. Головной мозг по структурной организации и развитию серого и белого вещества не отличается от нормы. Почки также не отличаются и не имеют морфологических признаков патологии (данные не приводятся). В печени Ag-A30 животных патологических изменений не зарегистрировано (рис. 3а). В то же время в печени Ag-180 крыс наблюдается выраженная пигментация стенки вен, проходящих в междольковой соединительной ткани (ветви воротной вены) и очаговые скопления черных гранул в макрофагах междольковой соединительной ткани (рис. 3б и 3в). После последовательной обработки срезов растворами йода и тиосульфата натрия обнаруженная пигментация исчезала, что свидетельствует о вероятном присутствии в стенке воротной

**Таблица 3.** Влияние Ag-диеты на исследуемые биохимические и физиологические показатели у взрослых Ag-крыс

Показатели	Группы животных		
	Контроль	Ag-A30	Ag-180
<b>Сыворотка крови</b>			
[Cu], мкг/л	1306 ± 100	120 ± 10	981 ± 28
[Ag], мкг/л	–	2052 ± 213	4000 ± 243
*[ЦП] белок, мг/дЛ (n=8)	65±7	58±5	60±8
**Оксидазная активность, мг/дЛ	38.5 ± 3.4	1.7 ± 0.51	20 ± 0.7
***Ферроксидазная активность, у.е.	0.7 ± 0.16	0.02	0.49 ± 0.1
<b>Физиологические показатели</b>			
Возраст половой зрелости, дни	60–70	–	60–70
Плодовитость, число крыс в помете	10±2	–	5±1
Жизнеспособное потомство	90%	0%****	90%

\* – определено методом ракетного иммуноэлектрофореза. \*\* – определено с помощью *para*-фенилендиамина. \*\*\* – колориметрическое измерение в геле. \*\*\*\* – данные по Shavlovski et al., 1995.



**Рис. 3.** Сравнительный анализ гистологических препаратов некоторых органов и тканей Ag-A30 и Ag-180 крыс. Печень ((а), (б), (в), (г)) – стрелками обозначены стенки сосудов ((а), (б), (г)) и макрофаги (в). Селезенка ((д), (е), (ж), (з)). Кожа Ag-A30 крысы (и). Подкожные инфильтраты у Ag-180 крысы (к) – пятна, не отмеченные стрелками – травмы после выщипывания шерсти.

вены преципитатов солей серебра и/или металлического серебра (рис. 3г). В междольковой соединительной ткани печени Ag-180 животных часто обнаруживались эозинофильные гранулоциты, что не типично для контроля. Гистологические срезы селезенки Ag-A30 крыс (рис. 3д) не отличались от контрольных срезов (данные не приводятся). В красной пульпе определялось небольшое количество коричневого пигмента. Среди клеток встречались одиночные эозинофильные гранулоциты (как правило, на границе с белой пульпой) (рис. 3ж). При окраске по Перлсу в красной пульпе определялись многочисленные очаговые скопления железа. У Ag-180 животных при сохранении больших скоплений железа увеличен объем белой пульпы,

больше эозинофильных гранулоцитов и черно-коричневого пигмента по сравнению с контрольными животными (рис. 3е и 3з). Очаговые скопления темного инфильтрата выявлены под кожей Ag-180 крыс (рис. 3и и 3к).

Содержание гемоглобина в крови у Ag-180 крыс и животных контрольной группы одинаково: 128–192 г/л, то есть колеблется в пределах нормальных значений (Sharp, LaRegina, 1998). Профиль лейкограммы крови показал, что у Ag-180 крыс по сравнению с животными контрольной группы достоверно повышается количество эозинофилов:  $6.7 \pm 2.5$  и  $3.4 \pm 1.5$  ( $p < 0,05$ ) соответственно, что согласуется с данными гистологического анализа.

#### *Экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом меди, у Ag-крыс*

#### **Белки МСМ печени крысы, гены которых взяты в рассмотрение.**

1. Купроэнзимы. ЦП (ген *Cp* № 2387) – ферроксидаза, контролирует транспорт железа, и одновременно служит донором меди для клеток негепатоцитарных рядов: Ср (ЦП) и GPI–Ср (ГФИ-ЦП), секреторный и связанный с плазматическими мембранами посредством гликозилфосфатидилинозитолового якоря соответственно (Prohaska, 2011). Супероксиддисмутазы: Cu/Zn-SOD1 (ген *Sod1* № 3731) – ключевой фермент антиоксидантной системы клетки; Mn-SOD2 (ген *Sod2* № 3732) – осуществляет антиоксидантную функцию в митохондриях (Zelko et al., 2002). Цитохром-с-оксидаза – COX (ген *Cox4i1* № 683741) изоформа 1 субъединицы IV комплекса цитохром-с-оксидазы 1, необходимая для сборки функциональной структуры фермента (Richter, Ludwig, 2003).

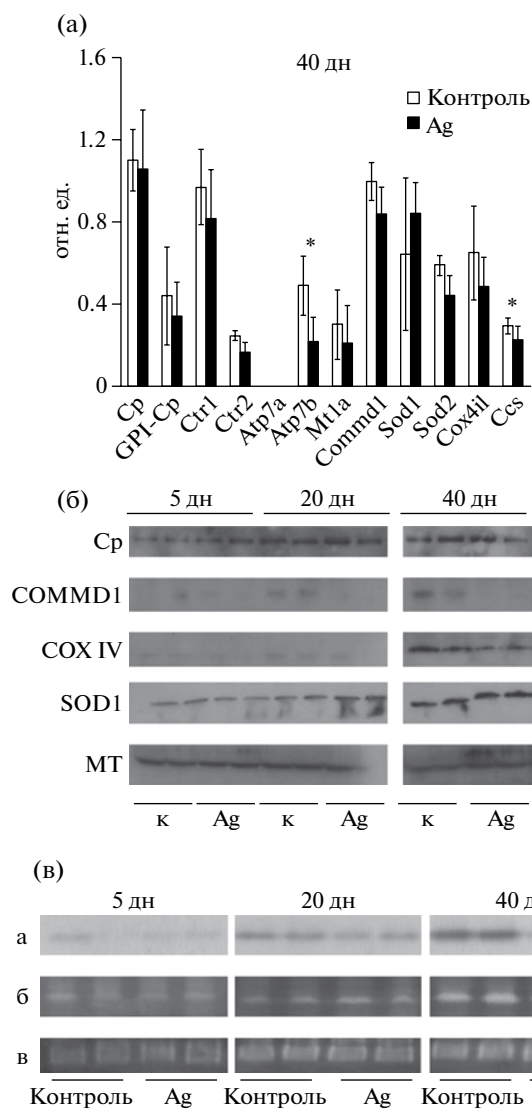
2. Транспортеры меди. Высоко аффинный транспортер Cu(I) клеточной мембраны STR1 (ген *Slc31a1* № 620059) (Wang et al., 2011; Скворцов и др., 2012). Внутриклеточный низко аффинный транспортер меди STR2 (ген *Slc31a2* № 1307963) (Berghe et al., 2007). Медьтранспортные АТФ-азы Р1 типа: АТФ7А (ген *Atp7a* № 2179), АТФ-аза Менкеса, обеспечивает встраивание меди в активные центры секреторных купроэнзимов; АТФ7В (ген *Atp7b* № 2180), АТФ-аза Вильсона, обеспечивает экскрецию меди из клеток (Lutsenko et al., 2008). Cu(I)-шаперон CCS (ген *Ccs* № 84485), доставляющий медь к SOD1 (Caruano-Yzermans et al., 2006).

3. Белки, поддерживающие гомеостаз меди в цитозоле. Металлотионеин, Mtl1 (ген *Mtl1* № 3117), обогащенный цистеином белок, выступающий в роли донора и акцептора Cu(I)/Cu(II) (Nielsen et al., 2007). Белок цитозоля COMM1 (ген *Comm1* № 1311771), контролирующий уровень меди внутри клетки путем ее экскреции (Fieten et al., 2012).

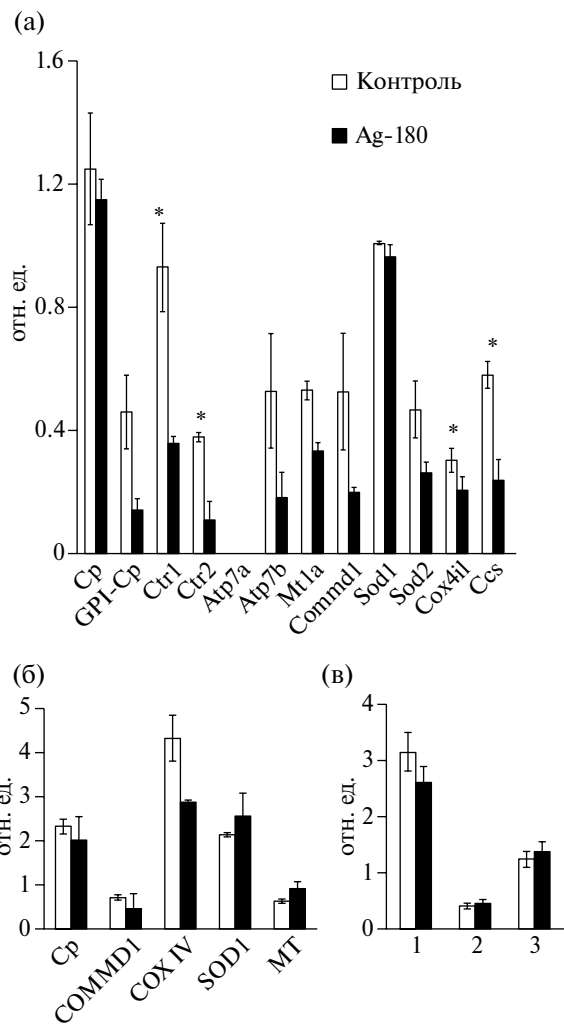


В печени 5- и 20-дневных Ag-крыс транскрипционная активность исследуемых генов по сравнению с контролем не меняется (данные не при-

водятся). В печени 40-дневных Ag-крыс происходит достоверное снижение уровня мРНК, кодирующих *Atp7b* и *Ccs* (рис. 4а). К 40-му дню жизни у Ag-крыс не изменяется содержание иммунореактивных полипептидов SOD1 и MT1A (рис. 4б). При этом снижается содержание белков COMMD1 и COX в цитозоле и митохондриях, соответственно. Содержание ЦП в крови повышается примерно в 2 раза. Анализ ферментативной активности купроэнзимов показал, что в сыворотке крови



**Рис. 4.** Экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом меди, у Ag-40 крыс. (а) – транскрипционная активность исследуемых генов в печени контрольных и Ag-40 крыс (□ – контрольные крысы; ■ – Ag-40 крысы, \*:  $p < 0,05$ ); (б) – содержание иммунореактивных полипептидов в сыворотке крови (Cp – церулоплазмин), цитозоле (COMMD1, SOD1, MT) и в митохондриях (COXIV) контрольных и Ag-40 крыс. На дорожках: 0,05 мкл сыворотки крови для выявления ЦП, 80 мкг белка цитозоля для выявления COMMD1 и MT, и 20 мкг белка цитозоля и митохондрий для выявления SOD1 и COXIV соответственно; (в) – ферментативная активность купроэнзимов контрольных и Ag-крыс в раннем онтогенезе: а – оксидазная активность ЦП. На дорожках: по 1 мкл образца сыворотки крови; б – ферроксидазная активность ЦП. На дорожках: по 5 мкл образца сыворотки крови; в – активность SOD1. На дорожках: по 50 мкг белка цитозоля печени.



**Рис. 5.** Экспрессия генов метаболической системы меди в печени Ag-180 крыс. (а) – транскрипционная активность исследуемых генов медь-транспортных белков и купроэнзимов. \*:  $p < 0,05$ ; (б) – иммуноблоттинг ЦП в сыворотке крови (1 мкл на дорожку); COXIV в митохондриях (20 мкг белка на дорожку); SOD1 в цитозоле (20 мкг белка на дорожку); COMMD1 (80 мкг белка на дорожку) и MT (80 мкг белка на дорожку); (в) – результаты измерения ферментативной активности в геле: 1 – SOD1 в цитозоле, 2 – в митохондриях, 3 – в цитозоле мозга (50 мкг белка на дорожку); □ – контрольные крысы; ■ – Ag-180 крысы.

Ag-животных к 40-му дню жизни в два раза снижаются оксидазная и ферроксидазная активности ЦП (рис. 4в – а, б). Ферментативная активность SOD1 не меняется (рис. 4в – в). В печени Ag-180 крыс снижается уровень мРНК, программирующих синтез полипептидов *Ctrl1*, *Ctrl2*, *Mt1a*, *Commd1* и *Cox4i1* (рис. 5а). Уровень экспрессии других генов, взятых в рассмотрение, достоверно не изменяется. Эти данные согласуются с данными по выявлению соответствующих иммунореактивных полипептидов методом иммуноблотинга (рис. 5б). Видно, что у Ag-180 содержание полипептидов ЦП, SOD1 и MT не изменяется. Уровень COMMD1 и COX IV снижается. Уровень ферментативной активности SOD1 в цитозоле печени и мозга, а также в митохондриях печени практически одинаков (рис. 5в). Активность SOD3 в сыворотке крови Ag-180-крыс в два раза выше, чем у контрольных ( $155 \pm 55$  е.а./л и  $68 \pm 19$  е.а./л соответственно).

### ОБСУЖДЕНИЕ

В работе приведены данные, демонстрирующие динамику влияния хронической Ag-диеты на онтогенез-опосредованное переключение эмбрионального типа метаболизма меди на взрослый. Исследование выполнено на крысах с измененным статусом меди, которое достигалось благодаря развитию искусственного дефицита меди, вызванного Ag-диетой. С момента рождения в течение шести месяцев жизни Ag-крысы получали ионы серебра и не проявляли признаков токсикоза. Этот длительный эксперимент позволил сравнить эффекты воздействия поступающего с пищей серебра на различных этапах онтогенеза лабораторных крыс без полного или частичного блокирования поступления меди с пищей, а также сравнить эффекты продолжительности Ag-диеты на исследуемые параметры метаболизма меди у взрослых Ag-крыс: Ag-A30 и Ag-180.

У крыс, получающих ионы Ag в составе ЦП молока (Ag-5 и Ag-20, эмбриональный и ранний период взрослого типа метаболизма меди соответственно) серебро снижает статус меди (табл. 2), но не влияет на метаболизм меди в печени и смену эмбрионального типа метаболизма меди на взрослый. Содержание серебра в сыворотке крови соответствует уровню ЦП, в который включены атомы серебра. В течение первых дней развития в печени крыс всех групп концентрация меди растёт и после перехода на взрослый тип метаболизма меди резко падает, как и у контрольных крыс. Перенос серебра в организме новорожденных происходит по тем же путям, которые использует медь. Накопление серебра не приводит к дефициту меди в печени и мозге Ag-животных. После 20-го дня жизни крысы

наряду с молоком матери начинают потреблять и твердый корм с AgCl. С переходом на смешанное питание, а затем полностью на твердый корм, к 40-му дню жизни в сыворотке крови Ag-крыс, по сравнению с контрольной группой, происходят следующие изменения: снижение статуса меди в два раза (табл. 2), снижение активности генов меди транспортных и меди связывающих белков, участвующих в метаболизме меди (*Atp7b*, *Ccs*) (рис. 4а и 4б). При этом ферментативная активность SOD1 в цитозоле клеток печени этих животных остается неизменной (рис. 4в – в). Выявленные отличия некоторых параметров метаболизма меди у Ag-40 крыс по отношению к соответствующим показателям 5- и 20-дневных Ag крыс не влияли на их развитие. У Ag-180 крыс на фоне равномерного незначительного снижения содержания меди во всех взятых в рассмотрение органах увеличение содержания серебра произошло неравномерно (табл. 2, рис. 2). Содержание серебра в органах Ag-крыс, получающих серебро в течение длительного времени, значительно ниже, чем у взрослых крыс, подвергшихся воздействию Ag-диеты всего на протяжении 30 дней. Этот эффект может быть следствием экскреции серебра и образованием инертных Ag(0) гранул во внеклеточных пространствах, например, в коже (рис. 3к), что похоже на осаждение избытка меди в качестве Cu(0), характерное для болезни Вильсона (Ferenc, 1998). Анализ гистологических срезов печени и селезенки Ag животных выявил отличия от контрольных только у Ag-180 крыс (рис. 3). Статус меди у этой группы животных по отношению к их ровесникам из контрольной группы снизился в 2 раза. Следует отметить, что снижение статуса меди в 2 раза было отмечено нами и у Ag-крыс в возрасте 3 месяца (данные не приводятся). Содержание животных на Ag-диете до 6-ти месячного возраста (Ag-180 крысы) позволило сравнить эффекты длительного поступления серебра на метаболизм меди во взрослом состоянии с эффектами поступления серебра с пищей в течение 30 дней, которые выявляются у животных, получающих такую диету уже во взрослом состоянии (Ag-A30). У Ag-A30 крыс после месяца содержания на Ag-диете в сыворотке крови развивается недостаточность меди, ассоциированной с ЦП (Клотченко и др., 2008; Zatulovskiy et al., 2012; Ильичева и др., 2012; Пучехова et al., 2014). В сыворотке крови этих животных отсутствуют оксидазная и ферроксидазная активности (табл. 3). Эти животные теряют способность давать жизнеспособное потомство (Shavlovski et al., 1995). Ферментативная активность SOD1 и SOD3 (Zatulovskiy et al., 2012) не изменялись. У крыс Ag-180 оксидазная и ферроксидазная активности ЦП были снижены только

в 2 раза по отношению к контрольной группе животных (табл. 3). Они давали жизнеспособное потомство. Исходя из этого, можно сделать следующие заключения. Во-первых, ЦП сыворотки крови является важным источником меди для развивающихся эмбрионов. Этот вывод согласуется с данными, полученными на мышах с генотипом  $Cp^{-/-}$ . ЦП-дефицитные мыши дают потомство в 2 раза меньшее, чем контрольные животные, хотя в печени новорожденных крыс из пометов медь-дефицитных самок содержание меди было в пределах нормы (Chu et al., 2012). Во-вторых, накопление меди в печени во время эмбрионального и раннего постнатального развития является важным процессом, который, вероятно, регулирует баланс меди в условиях ее экологически обусловленного дефицита. Этот процесс может включать в себя индукцию альтернативных транспортных путей меди.

Одним из доказательств существования такой альтернативы можно рассматривать сохранение у Ag-180 крыс 50% физиологической активности холо-ЦП, несмотря на высокий уровень серебра. Кроме того, в печени животных этой группы уже в возрасте сорока дней жизни изменяется профиль экспрессии генов белков, входящих в метаболическую систему меди (рис. 4). Об изменении транскрипционной активности генов белков, обеспечивающих ключевые клеточные процессы (хемотаксис, сигналинг, мембранный транспорт, состояние окислительно-восстановительной системы клетки, регуляцию транскрипции и активность рибосом) в клетках *Pseudomonas fluorescens*, свидетельствуют данные, полученные при воздействии разных концентраций смесей ионов металлов в течение разного по длительности времени обработки (Gómez-Sagasti et al., 2015). Транскрипционная активность генов, которые у млекопитающих кодируют белки канонического пути метаболизма меди: транспорт, распределение и выведение ионов меди (*CTR1*, *CTR2*, *COMMD1*, *MT* и *CCS*), в печени Ag-180 снижается достоверно (рис. 5). Тем не менее, относительное содержание иммунореактивных полипептидов белков MT не уменьшилось. Возможно, что снижение транскрипции генов этих многофункциональных белков, участвующих и в других, кроме метаболизма меди, биологических процессах (Takahashi, 2012), было компенсировано увеличением периода полураспада молекулы белка. Эти факты свидетельствуют в пользу того, что у Ag-180 крыс в сыворотке обнаруживается изоформа ЦП, которая синтезируется в другом органе, а не в печени. Ранее нами показано, что у Ag-180 крыс в крови циркулируют 2 изоформы ЦП: обладающая оксидазной активностью, которая секретруется в кровоток раньше, чем не обладающая этой активностью печеночная (Puechova et al., 2014). Мы

предположили, что у крыс, получавших серебро с первого дня жизни индуцируются внепеченочный синтез и секреция ЦП, который обеспечивает потребности растущего организма в меди. Это, по-видимому, и объясняет сохранение репродуктивной функции. Возможно, дефицит ЦП-связанной меди индуцирует компенсаторный внепеченочный синтез ЦП, который обеспечивает медью растущий организм. Таким органом, или одним из таких органов, может быть жировая клетчатка, как недавно показано нами (Puechova et al., 2017).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований. Проекты № 14-04-01640 (Ц.Н.В.) № 18-015-00481 (П.Л.В.) и № 16-34-60219, МК 2718.2018.4 (И.Е.Ю.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ильичева Е.Ю., Бабич П.С., Баршполец В.В. и др. Развитие лабораторных крыс, длительное время получавших с кормом соли серебра // Бюлл. Эксп. Биол. и Мед. 2012. Т. 153. № 3. С. 359–336.
- Клотченко С.А., Цымбаленко Н.В., Соловьев К.В. и др. Влияние ионов серебра на метаболизм меди и экспрессию генов медьтранспортных белков в печени крыс // ДАН. 2008. Т. 418. № 4. С. 549–552.
- Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Оптимизация метода иммуноцитохимического выявления нестина на парафинных срезах головного мозга крысы // Морфология. 2006. Т. 131. № 6. С. 78–80.
- Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. Мед. хим. 1990. № 2. С. 88–91.
- Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 368 с.
- Платонова Н.А., Жигулева Э.А., Цымбаленко Н.В. и др. Возрастные особенности биосинтеза и распределения церулоплазмينا в организме крыс // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 3. С. 171–182.
- Платонова Н.А., Барабанова С.В., Повалихин Р.Г. и др. *In vivo* экспрессия медь транспортных белков в отделах мозга крыс // Известия РАН. Сер. Биол. 2005. № 2. С. 108–120.
- Пучкова Л.В. Пищевая роль церулоплазмينا молока. Вопр. питания. 2015. № 4. С. 4–17.
- Пучкова Л.В., Платонова Н.А. Механизм, обеспечивающий гомеостаз меди у эукариотов, и его связь с транспортом железа // Усп. совр. биол. 2003. Т. 123. № 1. С. 41–58.
- Скворцов А.Н., Затуловский Е.А., Пучкова Л.В. Структурно-функциональная организация CTR1, высоко

- аффинного импортера меди эукариотов, определяет его способность транспортировать медь, серебро и цисплатин // Мол. Биол. 2012. Т. 46. № 2. С. 335–347.
- Скворцов А.Н., Ильичева Е.Ю., Затуловский Е.А. и др. Частичная характеристика церулоплазмина крысы, выделенного из сыворотки крови животных, получавших с пищей соли серебра // Цитология. 2010. Т. 52. № 11. С. 70–76.
- Armendariz AD, Gonzalez M, Loguinov AV et al. Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of Prnp and App // Physiol. Genomics. 2004. V. 20. № 1. P. 45–54.
- Banci L., Bertini I., Cantini F. et al. Cellular copper distribution: a mechanistic systems biology approach // Cell. Mol. Life Sci. 2010. V. 67. № 15. P. 2563–2589.
- van den Berghe P.V.E., Folmer D.E., Malingre H.E. M. et al. Human copper transporter 2 is localized in late endosomes and lysosomes and facilitates cellular copper uptake // Biochem. J. 2007. V. 407. № 1. P. 49–59.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 2. P. 248–254.
- Caruano-Yzermans A.L., Bartnikas T.B., Gitlin J.D. Mechanisms of the copper-dependent turnover of the copper chaperone for superoxide dismutase // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 19. P. 13581–13587.
- Chen H., Attieh Z.K., Su T. et al. Hephaestin is a ferroxidase that maintains partial activity in sex-linked anemia mice // Blood. 2004. V.103. № 10. P. 3933–3939.
- Choi D.W., Do Y.S., Zea C.J. et al. Spectral and thermodynamic properties of Ag(I), Au(III), Cd(II), Co(II), Fe(III), Hg(II), Mn(II), Ni(II), Pb(II), U(IV), and Zn(II) binding by methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b // J. Inorg. Biochem. 2006. V.100. № 12. P. 2150–2161.
- Chu Y.L., Sauble E.N., Cabrera A. et al. Lack of ceruloplasmin expression alters aspects of copper transport to the fetus and newborn, as determined in mice // BioMetals. 2012. V. 25. № 2. P. 373–382.
- Elechiguerra J.L., Burt J.L., Morones J.R. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1 // J. Nanobiotechnology. 2005. V. 3. № 1. P. 6–16.
- Fieten H., Leegwater P.A. J., Watson A.L. et al. Canine models of copper toxicosis for understanding mammalian copper metabolism // Mamm. Genome. 2012. V. 23. № 1–2. P. 62–75.
- Ferenci P. Wilson's disease // Clin. Liver Dis. 1998. V. 2. № 1. P. 31–49.
- Gaitskhoki V.S., L'yon V.M., Monakhov N.K. et al. Intracellular distribution of rat-liver polyribosomes synthesizing ceruloplasmin // Eur. J. Biochem. 1981. V. 115. № 1. P. 39–44.
- Gómez-Sagasti M.T., Becerril J.M., Epelde L. et al. Early gene expression in *Pseudomonas fluorescens* exposed to a polymeric solution // Cell Biol. Toxicol. 2015. V. 31. № 1. P. 39–81.
- Gupta A, Lutsenko S. Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential // Future Med. Chem. 2009. V. 1. № 6. P. 1125–1142.
- Harvey L.J., Ashton K., Hooper L. et al. Methods of assessment of copper status in humans: a systematic review // Am.J. Clin. Nutr. 2009. V. 89. № 6. P. 2009–2024.
- Hordyjewska A., Popiołek Ł., Kocot J. The many “faces” of copper in medicine and treatment. // Biometals. 2014. V. 27. № 4. P. 611–621.
- Hurley L.S., Keen C.L., Lönnerdal B. Copper in fetal and neonatal development // Ciba Found. Symp. 1980. V.79. № 6. P. 227–245.
- Ilyechova E., Skvortsov A., Zatulovsky E. et al. Experimental switching of copper status in laboratory rodents // J. Trace Elem. Med. Biol. 2011. V. 25. № 1. P. 27–35.
- Ilyechova E. Yu., Saveliev A.N., Skvortsov A.N. et al. The effects of silver ions on copper metabolism in rats // Metallomics. 2014. V. 6. № 10. P. 1970–1987.
- Ilyechova E.Y., Tsymbalenko N.V., Puchkova L.V. The role of subcutaneous adipose tissue in supporting the copper balance in rats with a chronic deficiency in holoceruloplasmin. plos One 2017. V. 12. № 4: e0175214.
- Lansdown A.B. A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices // Adv. Pharmacol. Sci. 2010. 2010:910686.
- Lewinska-Preis, L., Jablonska, M., Fabianska, M.J. et al. Bioelements and mineral matter in human livers from the highly industrialized region of the Upper Silesia Coal Basin (Poland). Environ. Geochem. Health // 2011. V. 33. № 6. P. 595–611.
- Liu J.J., Galetti P., Farr A. et al. In vitro antitumour and hepatotoxicity profiles of Au(I) and Ag(I) bidentatepyridyl phosphine complexes and relationships to cellular uptake // J. Inorg. Biochem. 2008. V. 102. № 2. P. 303–310.
- Lutsenko S., Gupta A., Burkhead J.L. et al. Cellular multitasking: The dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance // Arch. Biochem. Biophys. 2008. V. 476. № 1. P. 22–32.
- Marone M., Mozzetti S, De Ritis D. et al. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample // Biol. Proc. Online. 2001. № 3. P. 19–25.
- Medvetz D.A., Hindi K.M., Panzner M.J. et al. Anticancer activity of Ag(I) N-heterocyclic carbene. Complexes derived from 4,5-dichloro-1H-imidazole // Met. Based Drugs. 2008. 2008: 384010.
- Nielsen A.E., Bohr A., Penkowa M. The balance between life and death of cells: roles of metallothioneins // Biomarker Insights. 2007. № 1. P. 99–111.
- Owen C.A., Smith H. Detection of ceruloplasmin after zone electrophoresis // Clin. Chim. Acta. 1961. № 6. P. 441–444.

- Payne J.L., Ambrosio A.M. Evaluation of an antimicrobial silver foam dressing for use with V.A.C. therapy: morphological, mechanical, and antimicrobial properties // *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2009. V. 89. № 1. P. 217–222.
- Penland J.G., Prohaska J.R. Abnormal motor function persists following recovery from perinatal copper deficiency in rats // *J. Nutr.* 2004. V. 134. № 8. P. 1984–1988.
- Petris M.J., Smith K., Lee J. et al. Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1 // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 11. P. 9639–9646.
- Prohaska J.R. Impact of copper limitation on expression and function of multicopper oxidases (ferroxidases) // *Adv. Nutr.* 2011. V. 2. № 2. P. 89–95.
- Prohaska J.R., Gybina A.A. Intracellular copper transport in mammals // *J. Nutr.* 2004. V. 134. № 5. P. 1003–1006.
- Richter O. – M.H., Ludwig B. Cytochrome c oxidase – structure, function, and physiology of redox-driven molecular machine // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2003. V. 147. P. 47–74.
- Sharp P.E., La Regina V.C. *The Laboratory Rat. Series: Laboratory animal pocket reference.* 1998 by CRC Press. 240 p. <https://www.crcpress.com/The-Laboratory-Rat/Sharp-La-Regina/p/book/9780849325656>
- Shavlovski M.M., Chebotar N.A., Konopistseva L.A. et al. Embryotoxicity of silver ions is diminished by ceruloplasmin – further evidence for its role in the transport of copper // *BioMetals.* 1995. V. 8. № 2. P. 122–128.
- Takahashi S. Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies // *J. Hematol. Oncol.* 2012. № 5. P. 41–49.
- Vives-Bauza C., Starkov A., Garcia-Arumi E. Measurements of the antioxidant enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase // *Methods Cell. Biol.* 2007. V. 80. P. 379–393.
- Wang Y., Hodgkinson V., Zhu S. et al. Advances in the understanding of mammalian copper transporters // *Adv. Nutr.* 2011. V. 2. № 2. P. 129–137.
- Zatulovskaia Y.A., Ilyechova E.Y., Puchkova L.V. The features of copper metabolism in the rat liver during development. *PLoS One.* 2015. V.10. 10: e0140797.
- Zatulovskiy E.A., Skvortsov A.N., Rusconi P. et al. Serum depletion of holo-ceruloplasmin induced by silver ions in vivo reduces uptake of cisplatin // *J. Inorg. Biochem.* 2012. V. 116. № 1. P. 88–96.
- Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression // *Free Radical Biol. Med.* 2002. V. 33. № 3. P. 337–349.

## Effect of Silver Ions on Copper Metabolism during Mammalian Ontogenesis

E. Yu. Ilyechova<sup>1, 3, \*</sup>, L. V. Puchkova<sup>1, 2, 3</sup>, M. M. Shavlovskii<sup>1</sup>, D. E. Korzhevskii<sup>1</sup>,  
E. S. Petrova<sup>1</sup>, and N. V. Tsymbalenko<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376 Russia*

<sup>2</sup>*Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 19525 Russia*

<sup>3</sup>*ITMO University, St. Petersburg, 197101 Russia*

\*E-mail: [ilichevaey@gmail.com](mailto:ilichevaey@gmail.com)

Received October 17, 2017; in final form, November 15, 2017

Copper metabolism was studied in laboratory rats that received silver ions with food (Ag diet) from birth for 5, 20, 40, and 180 days. Parameters of the copper status in the blood serum were determined, and data on the distribution of silver ions in the body were obtained. A comparative histological analysis of brain, liver, kidney, and spleen sections of adult rats kept on the Ag diet for 30 or 180 days was performed. Copper and silver content, expression levels of the genes of copper transport proteins, and the activity of copper enzymes were determined in the cells of the liver, the central organ responsible for copper metabolism in mammals. In adult rats kept on the Ag diet for 30 days, copper status parameters dropped to near-zero values. In contrast, these parameters were decreased only twofold in rats that had been kept on the Ag diet for 6 months from birth. At the same time, the expression of genes involved in copper homeostasis was downregulated. The expression of genes that encode copper enzymes was unchanged. The activity of ceruloplasmin, the main copper-containing protein of the blood, was decreased, while the activity of SOD1, a cellular copper enzyme, was unchanged. The pathways by which silver can interfere with copper metabolism and the mechanisms that compensate these effects are discussed. The data obtained may help assess the potential consequences of growing environmental exposure to silver due to increasing use of silver nanoparticles in different areas of human activity.

**Keywords:** copper, silver, copper metabolism, dietary silver as an ecological factor, animal model