

На правах рукописи

ИЛЬЧЕВА
Екатерина Юрьевна

**МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ ИОНОВ СЕРЕБРА НА МЕТАБОЛИЗМ МЕДИ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении "Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины" Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор **Цымбаленко Надежда Васильевна**

Официальные оппоненты:

Шпаков Александр Олегович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии.

Дубинина Елена Ефимовна, доктор медицинских наук, профессор, Государственное учреждение "Санкт-Петербургский научно-исследовательский психоневрологический институт, им. В.М. Бехтерева Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию", главный научный сотрудник отделения клинико-диагностических исследований.

Ведущее научное учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Санкт-Петербургский государственный университет".

Защита состоится «__» _____ 2014 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д001.022.03 при Федеральном государственном бюджетном учреждении "Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины" Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук (197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12) по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения "Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины" Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук (197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12) и на сайте <http://www.iemrams.spb.ru/russian/disssov03.htm>

Автореферат разослан «_____» _____ 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета:

доктор биологических наук **Хныченко Людмила Константиновна**

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

У млекопитающих медь выполняет ряд функций. Она является структурным и энзиматическим ко-фактором жизненно важных купроэнзимов (*Tapiero et al., 2003*). От медь-опосредованного стимулирования эндотелиального фактора роста зависит процесс формирования сосудов (*Easter et al., 2010*). В макрофагах взрослых млекопитающих сигнальная система, в которой одним из звеньев является медь, участвует в ранних этапах формирования иммунного ответа (*Gérard et al., 2010*). Кроме того, медь участвует в регуляции клеточного цикла через индукцию апоптоза (*Mufti et al., 2007*), контролирует баланс между гликолизом и дыханием, изменение которого ведет к перепрограммированию нормального энергетического метаболизма на специфичный для опухолевых клеток (*Gogvadze et al., 2010*). При этом свойство меди связывать и активировать молекулярный кислород, в неконтролируемых условиях может приводить к образованию активных форм кислорода, которые действуют на клетки подобно ионизирующему излучению (*Armendariz et al., 2004*). Безопасный перенос меди осуществляет высококонсервативная метаболическая система меди (МСМ) (*Banci et al., 2010; Gupta, Lutsenko, 2009*). МСМ всех эукариотов сходны, они включают интегральные мембранные и растворимые цитозольные белки, кодируемые ортологичными генами. Белки МСМ транспортируют медь в состоянии окисления Cu(I) однонаправленно и последовательно при прямых белок-белковых взаимодействиях вниз по градиенту энергии связывания. В поддержании гомеостаза меди в целом организме ключевую роль играет печень.

Врожденные ошибки метаболизма меди и ее экологический избыток или недостаток, приводят к развитию тяжелых заболеваний (нейродегенеративные заболевания пожилого возраста, болезни сердечно-сосудистой системы, рак и др.) (*Manso et al., 2011; Gaggelli et al., 2006*).

Строение наружной электронной оболочки Cu(I) сходно с таковой у Ag(I) и их координационные свойства похожи (*Комтон, Уилкинсон, 1969*), поэтому медь-связывающие мотивы белков МСМ координируют и транспортируют Ag(I). Однако ни одного фермента, требующего для своей активности серебра, и ни одного физиологического процесса, зависящего от серебра, в живых организмах не обнаружено. В то же время использование серебра в хозяйственной деятельности человека постоянно растет, поэтому оно может стать фактором загрязнения окружающей среды. На это указывает то, что у морских млекопитающих его количество в печени увеличивается с возрастом. (*Nielson, 1986; Клотченко и др., 2008; Zatulovsky et al., 2012; Saeki et al., 2001*). Серебро, конкурируя с медью за транспортные белки, снижает биодоступность ионов меди (*Petris et al., 2003; Bertinato et al., 2010; Choi et al., 2006*) и встраивается в активные центры купроэнзимов (*Скворцов и др., 2010; Wilcoxon et al., 2011*), что приводит к потере их активности.

Это делает актуальным и необходимым исследование влияния серебра на различные аспекты метаболизма меди у млекопитающих, что отражается в

интересе к этой проблеме ряда ведущих лабораторий мира (*Barry et al., 2011; Ibricevic et al., 2010; Bertinato et al., 2010; Vest et al., 2013*).

Цель работы

Изучение гомеодинамики меди у крыс, длительное время употреблявших корм, содержащий ионы серебра.

Задачи исследования

1. Изучить влияние ионов серебра, в зависимости от начала Ag-диеты (1 кг стандартного корма содержит 50 мг хлорида серебра) и длительности ее применения, на показатели статуса меди в сыворотке крови (концентрация меди, содержание иммунореактивного церулоплазмينا (ЦП) и (ферр)оксидазная активность). В клетках печени оценить (а) активность генов МСМ на уровне транскрипции и содержания иммунореактивных полипептидов медь-связывающих белков, а также (б) измерить активность купроэнзимов цитозоля и сыворотки крови. Сравнить распределение Cu и Ag в организме крыс. Определить субклеточную локализацию серебра в клетках печени. На основе полученных данных выбрать такие группы крыс, у которых эффект Ag-диеты выражен наиболее отчетливо.
2. Провести сравнительный анализ влияния Ag-диеты на метаболизм меди у взрослых крыс, получавших серебро в течение месяца (Ag-A30 крысы), и взрослых крыс, получавших серебро в течение всей жизни (Ag-N180 крысы).
3. Изучить лектин-связывающие свойства изоформ ЦП Ag-N180 крыс и скорость их секреции.
4. Из сыворотки Ag-A30 и Ag-N180 крыс с помощью метода ионообменной хроматографии получить частично очищенные препараты ЦП и сравнить их физико-химические свойства.

Научная новизна полученных результатов

Все полученные в работе результаты являются новыми. Получены данные, указывающие на существование альтернативного механизма, поддерживающего уровень статуса меди у лабораторных грызунов при длительном поступлении с пищей ионов серебра. Показано, что эффекты Ag-диеты зависят от ее длительности и периода онтогенеза животных. Так, у Ag-A30 крыс в сыворотке крови концентрация меди и (ферр)оксидазная активность значительно снижаются, содержание иммунореактивного ЦП и активность генов МСМ печени не меняются.

В сыворотке крови Ag-N180 крыс концентрация меди и (ферр)оксидазная активность, по сравнению с контролем, снижаются только в 2 раза, концентрация иммунореактивного ЦП не меняется. Активность генов, чьи белковые продукты участвуют в транспорте меди, снижается. У Ag-N180 крыс сохраняется способность к репродукции, но количество крыс в пометах в 2 – 3 раза меньше по сравнению с контролем. ЦП Ag-N180 крыс по третичной структуре и ферментативной активности ближе к холо-ЦП, чем ЦП Ag-A30 крыс. Однако Ag-N180-ЦП крыс отличается от холо-ЦП и Ag-A30-ЦП крыс своей аффинностью к DEAE-Сефарозе, скоростью секреции в кровотоки и составом входящих в его структуру углеводов цепей.

Научно-практическое значение полученных результатов

Ag-крыс можно рассматривать как перспективную модель для фундаментальных исследований транспорта меди, механизмов ее распределения в организме и в клетках а также молекулярных механизмов формирования активных центров церулоплазмينا. Данные, демонстрирующие эффекты поступления в организм лабораторных животных пищевого серебра, послужат основой для рассмотрения серебра как экологического фактора. Они могут быть ценными для выработки научно-обоснованных рекомендаций по снижению эффекта загрязнения окружающей среды серебром (употребление воды, обеззараженной обработкой серебром, использование белья, импрегнированного солями серебра, обеззараживание воды в бассейнах и т.п.).

Методология и методы исследования

Работа является экспериментальным исследованием, которое выполнено на лабораторных крысах с использованием методов биохимии и молекулярной биологии: ОТ-ПЦР анализ, иммуноблотинг, иммуноэлектрофорез, хроматография, измерение концентрации металлов, УФ-спектров поглощения, спектров кругового дихроизма, определение активности ферментов в геле и спектрофотометрически, выделение субклеточных фракций, исследование гистологических срезов, проведение физиологических тестов, пульс-мечение радиоактивными изотопами.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Получение ионов серебра только в первые 23 дня жизни (период молочного вскармливания) не влияет на показатели статуса меди, и смену эмбрионального типа метаболизма меди на взрослый тип. У этих животных серебро переносится по тем же межорганным и внутриклеточным маршрутам, что и медь.
2. Содержание взрослых крыс на Ag-диете в течение примерно такого же времени (Ag-A30 крысы) приводит практически к исчезновению (ферр)оксидазной активности сыворотки крови и резкому снижению в ней концентрации меди. У Ag-A30 атомы серебра селективно накапливаются в печени. В клетках печени они аккумулируются в митохондриях. Ионы серебра переносятся в цистернальное пространство мембран аппарата Гольджи и встраиваются в молекулу ЦП. Относительное содержание зрелых транскриптов генов MCM не меняется.
3. У крыс, которых содержали на Ag-диете с первого дня жизни до 6-месячного возраста к 40-му дню (измерения проведены на 5, 20, 40 и 180 дни жизни) концентрация меди и (ферр)оксидазная активность в сыворотке крови снижаются в 2 раза. У Ag-N180 крыс серебро почти равномерно распределяется между органами. В гепатоцитах Ag-N180 крыс серебро распределяется между органеллами относительно равномерно, но его концентрация в цитозоле в несколько раз выше, по сравнению с Ag-A30 крысами. У Ag-N180 в кровотоке циркулируют две мажорные формы ЦП, которые отличаются по сродству к ДЕАЕ-Сефарозе, лектин-связывающим свойствам, скорости секреции в кровотоки. Одна из них синтезируется вне печени.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность результатов обеспечена разнообразием и адекватностью применяемых методов, соответствующих цели и задачам исследования, показанной в работе воспроизводимостью результатов, а также данными статистической обработки полученных результатов.

Результаты были доложены в форме устных и стендовых сообщений на: XXXVIII международной конференции по координационной химии (Иерусалим, Израиль, 2008), IV Съезде российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), XII – XVI Международных Пущинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука 21 века». (Пушино, 2008-2012), VI Съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010), IV Международном симпозиуме FESTEM «Микроэлементы и минералы в медицине и биологии» (Санкт-Петербург, 2010), XXI Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 2010). XI Международном симпозиуме «Металлы в биологии и медицине» (Кембридж, Великобритания, 2011), VIII Международной медной конференции «Медь в биологии» (Альгеро, Италия, 2012), XIII форуме молодых ученых европейской ассоциации биохимиков (Санкт-Петербург, 2013), IV Международном симпозиуме «Металломика» (Овьедо, Испания, 2013).

Личный вклад

Планирование работы, получение большей части экспериментальных результатов, их обработка и написание статей выполнены соискателем.

Структура диссертации

Рукопись содержит «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы», включающий 246 иностранных и 18 отечественных источников. Диссертация изложена на 148 страницах. Результаты представлены в 4 табл. и иллюстрированы 46 рис.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы взрослые крысы линии Вистар и их потомство, родившееся в виварии НИИЭМ СЗО РАМН. 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 (Prybil *et al.*, 1982).

Тотальную РНК изолировали с использованием реактива “TRIzol Reagent” (TriPure Isolation Reagent, Invitrogen). Концентрацию РНК измеряли спектрофотометрически. **Гель-электрофорез** ПЦР-продуктов проводили в 1.4% агарозном геле. Гели окрашивали этидий бромидом (Sambrook *et al.*, 1989). **Синтез кДНК в реакции обратной транскрипции** (ОТ) проводили на тотальной РНК со случайными праймерами; **ПЦР на полученной кДНК** проводили со специфическими праймерами (Клотченко и др., 2008). Для полуколичественной характеристики экспрессии генов использовали соотношение между уровнем мРНК исследуемого гена и мРНК β-актина (Marone *et al.*, 2001). **Выделение субклеточных фракций** из гомогената клеток, приготовленного в буфере, содержащем 0,25 М сахарозу, 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 100 мМ KCl, 8 мМ MgCl₂, 0,04% β-меркаптоэтанол, смесь ингибиторов протеаз фирмы “Sigma” (США) проводили методом дифференциального

или равновесного центрифугирования. Для **получения растворимого содержимого желудка новорожденных** навеску, взятую из полных желудков, ресуспендировали в двух объемах PBS, после инкубации в течение 30 мин при 0°C смесь центрифугировали в течение 10 мин и собирали супернатант для анализов. **Очищенный препарат ЦП выделяли** методом ионообменной хроматографии (Manolis&Cox, 1980). Для сравнительного анализа очищенных препаратов ЦП и Ag-ЦП использовали **круговой дихроизм и UV/vis спектрофотометрию**. **Гель-фильтрацию** проводили на колонке (1.6 x 40 см) с Сефадексом G-75 (superfine; 10-40 мкм) в 20 mM трис-HCl буфере, содержащем 5 mM 2-меркаптоэтанол, pH 7,6. **Электрофорез белков** проводили в ПААГ в неденатурирующих условиях, или в присутствии 0.1% ДДС по методу Laemmli. **Перенос белков** из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану и выявление специфических иммунных комплексов после гибридизации со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой, осуществляли с помощью хемилюменицентных проявителей. **Концентрацию меди** измеряли методом атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией и зеемановской коррекцией неселективного поглощения на спектрометре ZEE nit 650P "Analytik Jena" (Германия). **Оксидазную, ферроксидазную и супероксиддисмутазную активности** определяли в геле или спектрофотометрически окрашиванием специфических абиогенных субстратов. **Концентрацию ЦП** определяли методом количественного иммуноэлектрофореза. **Общий заряд ЦП, лектин-связывающую способность и антигенную микрөгетерогенность** исследовали с помощью 2D-иммуноэлектрофореза, 2D-аффиноиммуноэлектрофореза и перекрестного иммуноэлектрофореза, соответственно. **Нагруженность ферритина железом** была исследована окрашиванием неденатурирующего ПААГ 2% $K_4Fe(CN)_6$ в 2% HCl. **Концентрация гемоглобина** была измерена с помощью реактива Драбкина. Концентрацию цианометгемоглобина определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Для определения концентрации гемоглобина в крови использовали калибровочный график стандартов цианометгемоглобина. **Определение радиоактивности** проводили в сцинтилляционной жидкости, содержащей 4 г PPO и 0.1 г POPOP в 1 л толуола. **Количество новосинтезированного церулоплазмينا** определяли как процент от общей радиоактивности. Для проведения **гистологических исследований** препараты мозга, печени, почек и селезенки окрашивали гематоксилином и эозином, эозином (на эозинофильные гранулоциты), по Перлсу на железо (III). Проверку присутствия в составе пигментных отложений серебра проводили при помощи последовательной обработки срезов растворами йода и тиосульфата натрия. Для определения **лейкоцитарной формулы крови** крыс фиксированные мазки крови высушивали, окрашивали азур-эозином по Романовскому и подсчитывали количество форменных элементов. **Психо-эмоциональное состояние животных** оценивали с помощью физиологических тестов «Открытое поле» и «Условная реакция пассивного избегания». Статистическую обработку данных проводили с применением SPSS 9.0. Изменения принимали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния пищевых ионов серебра, на метаболизм меди проводили на взрослых крысах (Ag-A), получавших Ag-корм в течение месяца, и крысах, получавших Ag-корм, начиная с первого дня жизни до 6-месячного возраста (Ag-N) (Рисунок 1).

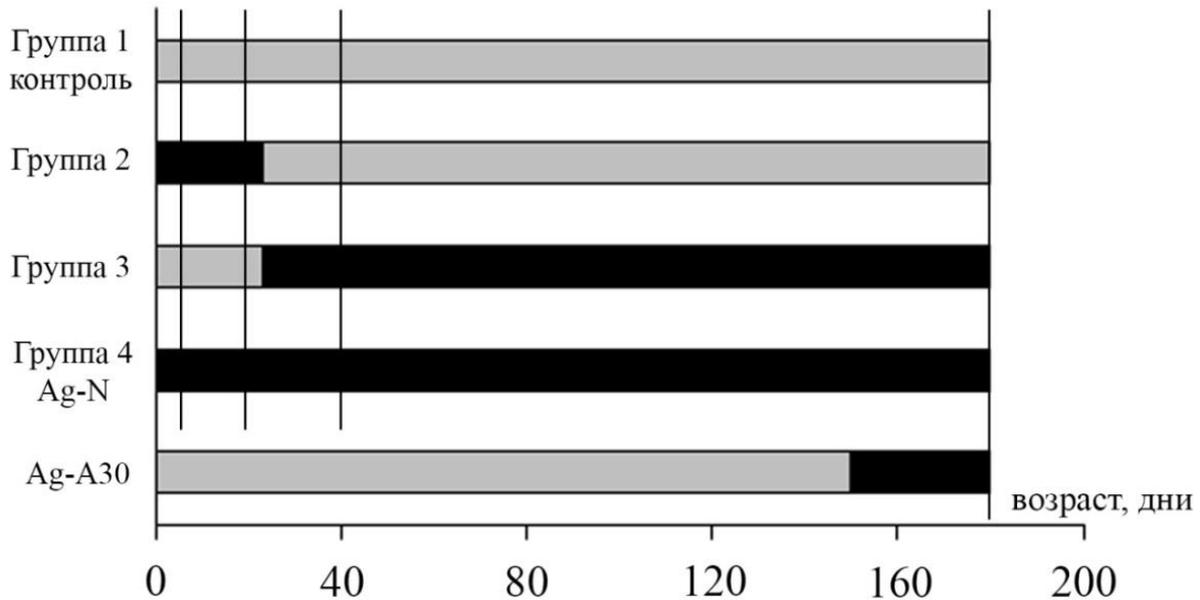


Рисунок 1. Группы животных, использованных в работе.

□ – стандартная диета; ■ – Ag-диета. Вертикальные линии показывают возраст крыс, вовлеченных в опыты: 5, 20, 40, 180 дней.

1. Влияние хлорида серебра на метаболизм меди у Ag-A30 крыс

Полученные данные показывают, что у Ag-A30 крыс в сыворотке крови практически полностью исчезает оксидазная активность, в норме на 95% принадлежащая ЦП, концентрация меди падает в 10 раз, а содержание белка ЦП, определенное методом иммуноблотинга, не снижается (Таблица 1, см. вкладку). Иммунопреципитация ЦП из сывороток крови крыс показала, что серебро и медь в крови преимущественно входят в состав ЦП (Рисунок 2).

Для выяснения степени устойчивости изменений статуса меди у Ag-A30 крыс им однократно внутрибрюшинно или *per os* вводили 10 мкг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ на 1 г массы тела. Введение ионов меди вызывает повышение уровня оксидазного ЦП (Рисунок 3), которое наблюдается уже через 1 ч после введения соли меди, а через 4 ч оксидазная активность практически восстанавливается и остается на нормальном уровне в течение всего периода наблюдения (72 часа), несмотря на продолжающуюся Ag-диету. Сопоставление скорости восстановления оксидазной активности и появления новосинтезированного ЦП позволяет предположить, что медь, введенная Ag-A30 крысам, уже через несколько минут поступает в комплекс Гольджи, где встраивается в апо-ЦП и, возможно, в Ag-ЦП.

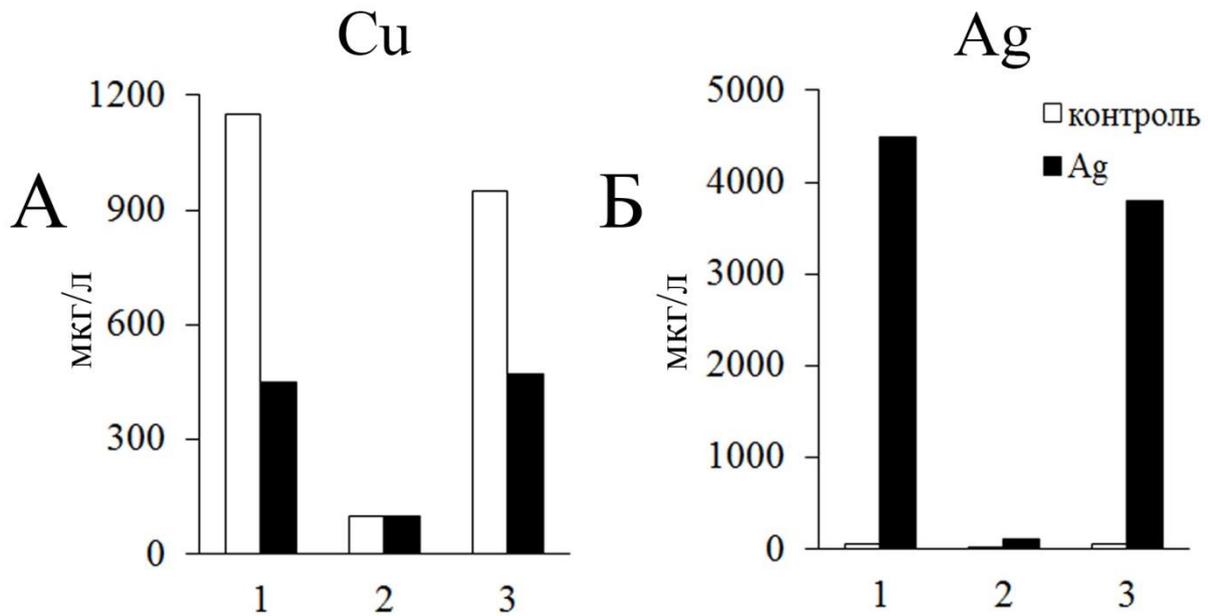


Рисунок 2. Концентрация меди и серебра, ассоциированных с ЦП в сыворотке крови контрольных и Ag-A15 крыс.

1 – сыворотка, 2 – непреципитированная антителами к ЦП фракция, 3 – иммунопреципитат. 50 μ л сыворотки крови инкубировали с 500 μ л антител к ЦП (1 мг/мл) в течение ночи при 4 °С при постоянном перемешивании. Преципитат получали центрифугированием 10,000 \times g, 20 мин, осадок дважды промывали PBS, растворяли в 0.4 мл азотной кислоты. Приведены средние данные по двум экспериментам.

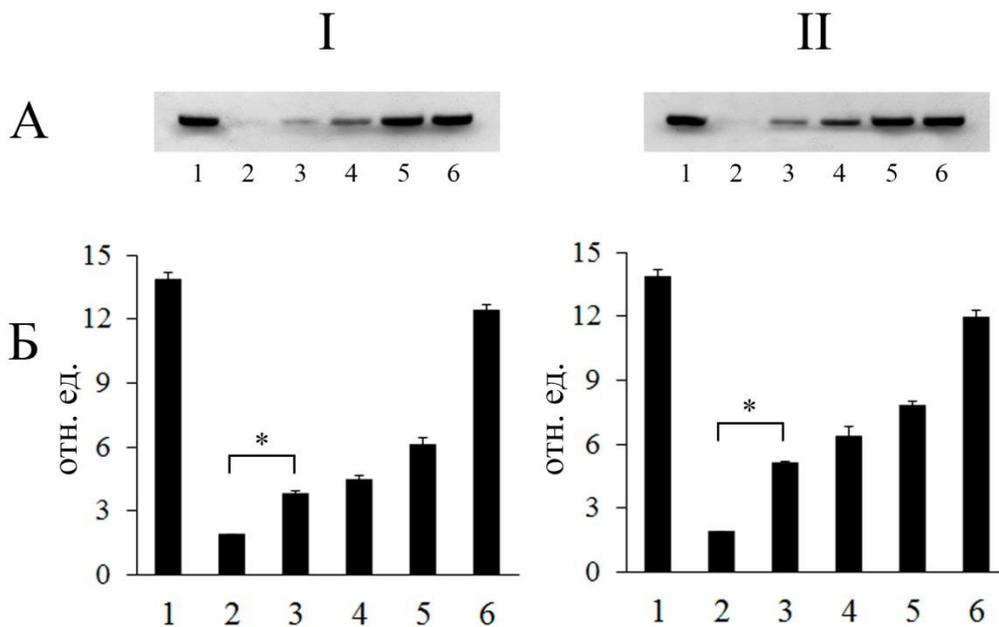


Рисунок 3. Восстановление оксидазной активности в сыворотке крови Ag-крыс после однократного введения CuSO_4 .

А - Изменение оксидазной активности сыворотки крови Ag-крыс после введения CuSO_4 *per os* (I) или внутривенно (II). I и II: 1-контроль, 2-Ag-A30, 3-6-Ag-A30 через 1 час, 4, 24, 72 часа после введения CuSO_4 . Б - Количественная оценка оксидазной активности тех же образцов сыворотки крови ($n=5$).

2. Исследование влияния хлорида серебра на метаболизм меди в течение постнатального периода развития

Для формирования групп крыс, получавших серебро с пищей с первого дня жизни, было проверено, поступает ли серебро в молоко крыс, и изменяется ли у новорожденных статус меди. Исследование было проведено на 10-дневных крысах, вскармливаемых самками, в корм которых с первого дня лактации добавляли AgCl (Ag-N10-крысы). Результаты, представленные на рисунке 4, показывают, что у Ag-N10 крыс серебро попадает в кровоток, аккумулируется преимущественно в печени и в незначительных количествах обнаруживается в мозге. При этом существенных изменений в концентрации меди не происходит. В это время серебро, как и медь, выводится с мочой. Содержание оксидазного ЦП Ag-N10-крыс снижается, при этом уровень иммунореактивного ЦП не меняется. У Ag-самок также развивается дефицит меди, ассоциированный с ЦП: уровень оксидазного ЦП в крови снижается, но содержание иммунореактивных полипептидов ЦП не меняется. Данные показывают, что новорожденные, вскормленные Ag-самками, получают ионы серебра.

На втором этапе были сформированы 4 группы крыс (Рисунок 1). *Группа 1* включала крыс, которые родились в виварии НИИЭМ одновременно с крысами, взятыми в экспериментальные группы, их использовали в качестве контроля как крыс того же возраста, содержащихся в тех же условиях. *Группу 2* составили крысы, вскормленные самками, получавшими Ag-диету с первого дня лактации (Ag-самки); в возрасте 23 дней крысы были переведены на стандартный корм (дефицит ионов меди только в период молочного вскармливания до месячного возраста). *Группа 3* была образована из крыс, которых перевели на Ag-диету после окончания периода молочного вскармливания (дефицит меди после снижения концентрации меди в печени). *Группа 4* была создана из крыс, которых вскармливали Ag-самки и после этого их переводили на Ag-диету.

У животных всех четырех групп была прослежена динамика действия ионов серебра на оксидазную активность ЦП (Рисунок 5, см. вкладку). Полученные данные показывают, что по отношению к контрольной группе оксидазная активность крыс групп 3 и 4 была примерно в два раза ниже.

Измерения концентрации меди в органах крыс показали, что после перехода на взрослый тип метаболизма меди, ее концентрация в печени у животных всех групп резко падает и остается на низком уровне (Рисунок 6, см. вкладку). В мозге концентрация меди растет примерно до половозрелого возраста и одинакова у животных всех групп. Накопление серебра в течение всего эксперимента продолжается и в печени, и в мозге. Однако концентрация серебра в мозге в 10 раз меньше, чем в печени.

Вес, а также индекс «масса тела/масса органов» у крыс групп 3 и 4, по сравнению с их ровесниками из групп 1 и 2, не отличается.

Психо-эмоциональное состояние исследуемых крыс оценивали с помощью физиологических тестов. В тесте «открытое поле» существенных различий в психо-эмоциональном состоянии животных, получавших с пищей серебро, по сравнению с контролем, не отмечено. Помимо этого, у всех крыс,

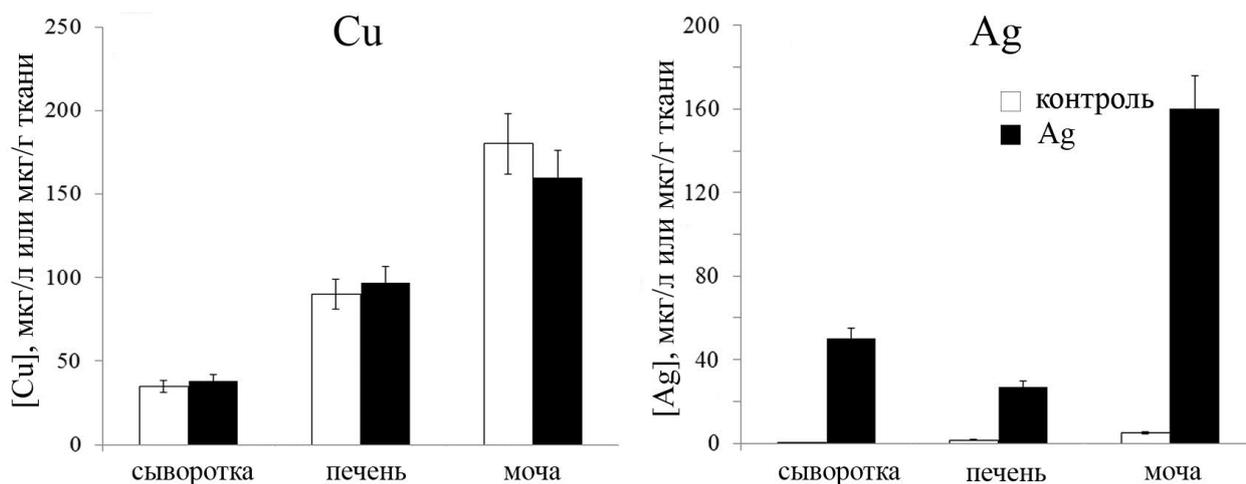


Рисунок 4. Транспорт и распределение меди и серебра в организме Ag-N10 крыс.

Ось ординат: концентрация Cu или Ag в сыворотке крови (мкг/100 мкл), печени и моче. (Данные получены совместно с Бабич П.С.).

не зависимо от времени введения в рацион серебра, наблюдается полное воспроизведение УРПИ, что свидетельствует о сохранении и воспроизведении их долговременной памятью выработанного навыка пассивного избегания.

Снижение показателей статуса меди у Ag-крыс групп 3 и 4 может происходить по одинаковому механизму, так как формирование взрослого типа метаболизма меди не исчерпывается снижением концентрации меди в печени на 13 день жизни. Повышение уровня оксидазного ЦП продолжается до 40 дня жизни (Рисунок 5, см. вкладку). Так как детали механизма смены типов метаболизма меди не известны, мы ограничили исследования работой только на крысах двух групп. **Группу 1** составили контрольные крысы. **Группу 2** – крысы, вскормленные Ag-самками, а затем в течение 6-ти месяцев получавшие Ag-корм (группа 4, Рисунок 1).

Для исследования уровня экспрессии генов, ассоциированных с метаболизмом меди, у Ag-N крыс в раннем постнатальном периоде развития в рассмотрение были взяты гены медь-связывающих и медьтранспортных белков, кодирующие: MT1a (низкомолекулярный, обогащенный цистеином белок, способный связывать Zn и Cu(I) и контролировать их гомеостаз), COMMD1 (цитозольный медь-связывающий белок, участвующий в экскреции меди), STR1 и STR2 (высоко и низко аффинные транспортеры Cu(I), соответственно), ATP7A и ATP7B (Cu(I)-транспортные АТРазы), CCS (Cu(I)-шаперон для супероксиддисмутазы). Также проанализирована активность генов, кодирующих купроэнзимы: ЦП, СОД1 и изоформу 1 субъединицы IV комплекса ЦО. В качестве сравнения измерена экспрессия гена СОД2, кодирующего митохондриальную Mn-СОД. Относительное количество зрелых транскриптов генов, взятых в рассмотрение, оценивали по данным полуколичественного ОТ-ПЦР анализа. Полученные данные показывают, что в печени 5- и 20-дневных Ag-крыс активность исследуемых генов по сравнению с контролем не меняется. В печени 40-дневных Ag-крыс происходит достоверное

снижение уровня мРНК, кодирующих CTR2, ATR7B и COMMD1 (Рисунок 7, А).

К 40-му дню жизни у Ag-крыс (Рисунок 7, Б) не изменяется содержание иммунореактивных полипептидов СОД1 и МТ. При этом снижается содержание белков COMMD1 и СОХIV в цитозоле и митохондриях, соответственно. Содержание ЦП в крови повышается примерно в 2 раза.

Анализ ферментативной активности купроэнзимов показал, что у Ag-N40 в два раза снижаются оксидазная и ферроксидазная активности церулоплазмينا (Рисунок 8). Ферментативная активность СОД1 не меняется.

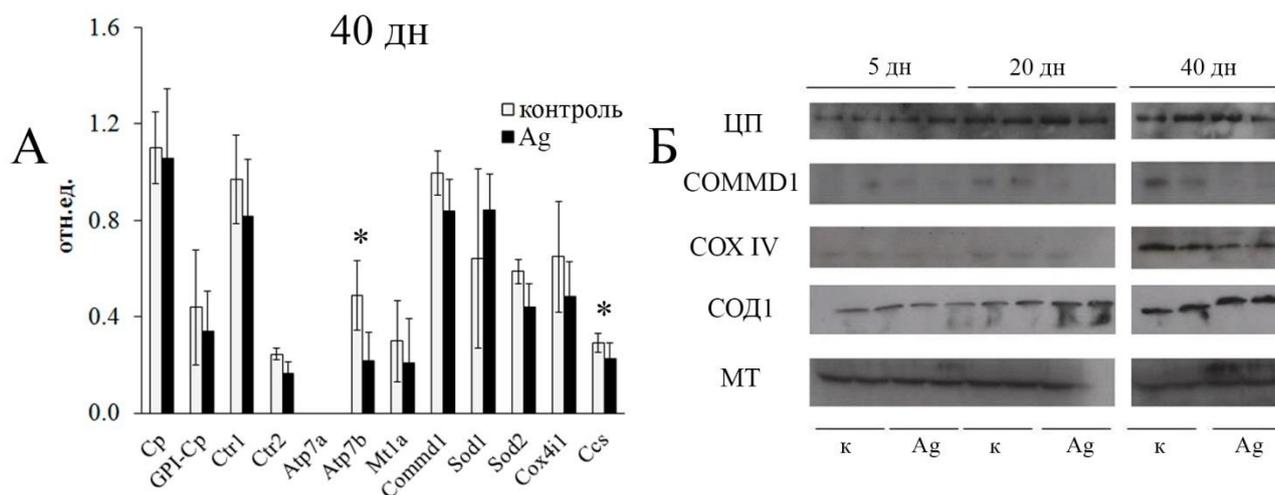


Рисунок 7. Экспрессия генов медь-транспортных белков и купроэнзимов.

А - Сравнение транскрипционной активности исследуемых генов в печени контрольных и Ag-N крыс в раннем постнатальном периоде. *: $p < 0,05$. **Б** - содержание иммунореактивных полипептидов На дорожках: 0,5 мкл сыворотки крови для анализа Ср, 80 мкг белка цитозоля для COMMD1 и МТ и 30 мкг белка цитозоля и митохондрий для анализа СОД1 и СОХ IV, соответственно.

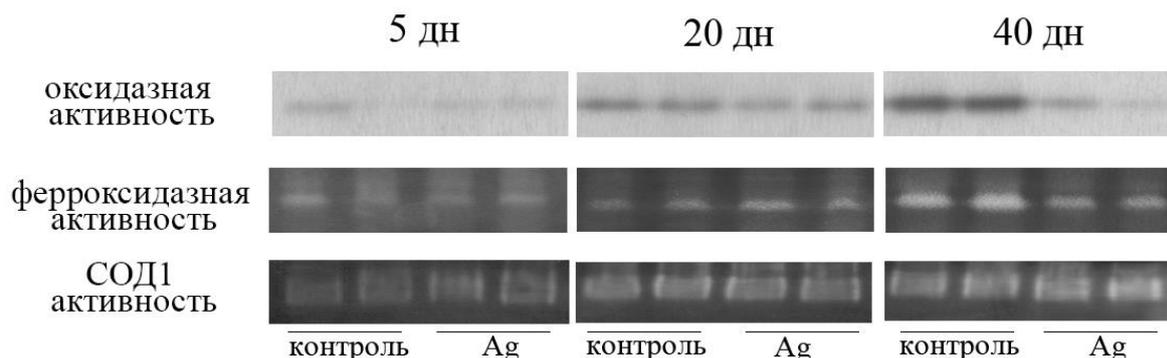


Рисунок 8. Ферментативная активность купроэнзимов контрольных и Ag-крыс в раннем постнатальном периоде.

Таким образом, данные, полученные на крысах Ag-N5, Ag-N20 и Ag-N40 показывают, что перенос серебра в организме новорожденных происходит по тем же путям, которые использует медь. При этом накопление серебра не приводит к дефициту меди в печени и мозге. В то же время, в сыворотке крови Ag-N40 крыс показатели статуса меди ниже в два раза, по сравнению с контролем.

3. Влияние длительной Ag-диеты на метаболизм меди крыс

В этом разделе представлены данные, полученные на крысах, которые с момента рождения и далее в течение шести месяцев получали с пищей AgCl – Ag-N180 крысы. Полученные данные сопоставлены с аналогичными данными, полученными на Ag-A30, или на контрольных крысах.

3.1. Показатели статуса меди у Ag-N180 крыс

У Ag-N180 крыс оксидазная активность ЦП в два раза ниже, чем у контрольных. Снижение ферроксидазной активности у крыс не было достоверным ($p=0.06$). Однако по данным иммуноэлектрофореза, уровень иммунореактивных полипептидов ЦП не отличается от такового у контрольных и Ag-A30 крыс (Таблица 1, см. вкладку).

3.2. Локализация ионов серебра в организме Ag-крыс

У Ag-N180 крыс распределение серебра между внутренними органами более равномерное, чем у Ag-A30 крыс, у которых серебро избирательно накапливается в печени (Рисунок 9, А). Распределение серебра в субклеточных фракциях печени Ag-крыс показано на рисунке 9, Б. Видно, что в клетках печени Ag-A30 крыс серебро избирательно аккумулируется в митохондриях, тогда как у Ag-N180-крыс оно почти равномерно распределено между ядрами, цитозолем и митохондриями и его количество в цитозоле увеличивается многократно.

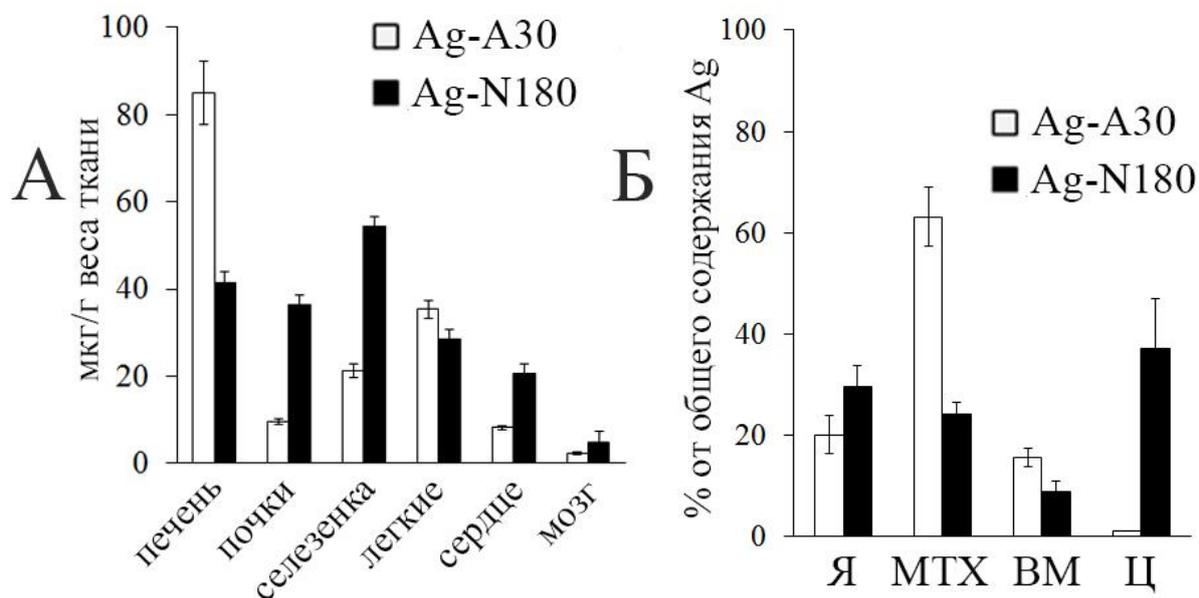


Рисунок 9. Распределение серебра в организме Ag-крыс ($n=3$).

А - Распределение серебра в организме Ag-крыс. □ - Ag-A30, ■ - Ag-N180. Б - Распределение серебра в клетках печени крыс. □ - Ag-A30, ■ - Ag-N180 крысы. Ось абсцисс: Я – ядра; Мт – митохондрии; ВМ – внутренние мембраны; Ц – цитозоль.

Сравнительный анализ гистологических срезов головного мозга, печени, почек и селезенки между Ag-A30 и Ag-N180 крысами показал, что головной мозг по структурной организации и развитию серого и белого вещества не отличается от нормы, и почки также не имеют морфологических признаков патологии (данные не приводятся). В печени Ag-A30 животных патологических изменений не зарегистрировано (Рисунок 10, А). В то же время в печени Ag-N180 крыс наблюдается выраженная пигментация стенки вен, проходящих в междольковой соединительной ткани (ветви воротной вены) и очаговые скопления черных гранул в макрофагах междольковой соединительной ткани (Рисунок 10, Б и В). После последовательной обработки срезов растворами йода и тиосульфата натрия обнаруженная пигментация исчезала, что свидетельствует о вероятном присутствии в стенке воротной вены преципитатов солей серебра и/или металлического серебра (Рисунок 10, Г).

Гистологические срезы селезенки Ag-A30 крыс (Рисунок 10, Д) 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) (Рисунок 10, Ж). При окраске по Перлсу в красной пульпе определялись многочисленные очаговые скопления железа. У Ag-N180 животных при сохранении больших скоплений железа увеличен объем белой пульпы, больше эозинофильных гранулоцитов и черно-коричневого пигмента по сравнению с контрольными животными (Рисунок 10, Е и З).

Кроме того, у Ag-N180 животных под кожей выявлены многочисленные скопления темного инфильтрата (Рисунок 10, И и К).

Содержание гемоглобина в крови у животных обеих групп одинаково (Таблица 1, см. вкладку) и колеблется в пределах нормальных значений (*Sharp, La Regina, 1998*). Профиль лейкограммы крови, показывает, что Ag-N180 крыс повышается количество эозинофилов, что согласуется с данными гистологического анализа. Эозинофилы, помимо основной, известной для них, про-аллергической / анти-аллергической функции, принимают участие во многих других процессах, и в представленной работе факт повышения их уровня у Ag-N180 не изучался.

3.3. Экспрессия генов, ассоциированных с метаболизмом меди, у Ag-N180 крыс

Данные полуколичественного ОТ-ПЦР анализа, приведенные на рисунке 11, показывают, что в печени Ag-N180 крыс снижается уровень мРНК, программирующих синтез CTR1, CTR2, MT1a, COMMD1, COX4i1, CCS. Уровень экспрессии других генов, взятых в рассмотрение, достоверно не изменяется.

Эти данные согласуются с данными иммуноблотинга по выявлению соответствующих иммунореактивных полипептидов (Рисунок 12, А). Уровень активности СОД1 в цитозоле печени и мозга, а также митохондриях мозга практически одинаков (Рисунок 12, Б, В и Г). Активность СОД3 у Ag-N180-

крыс в два раза выше, чем у контрольных (Таблица 1, см. вкладку). Не изменяется уровень нагруженности ферритина железом (Рисунок 12, Д).

3.4. Внутриклеточное распределение серебра в печени Ag-крыс

Для выявления белков, которые связывают серебро в цитозоле клеток печени Ag-N180 крыс, образцы цитозоля были фракционированы методом гелефильтрации на колонке с Сефадексом G75. Профили элюции (D_{280}) материала из контрольных и Ag-N180 крыс были идентичными. Поэтому приводится только цитозоль контрольных крыс (Рисунок 13, А, см. вкладку). На хроматограмме 2 основных пика (I и II), небольшой пик III и пик IV, который теоретически не должен содержать белки, а только низкомолекулярные компоненты.

Профили распределения меди на хроматограммах цитозоля печеночных клеток Ag-N180 и контрольных крыс не отличались (Рисунок 13, Б и В). Медь была выявлена во фракциях, соответствующих пикам I, II и III. Содержание меди в пике IV было чуть выше фонового уровня.

По данным иммуноблотинга материал пика I содержит ЦП (Рисунок 13, Б), что объясняется присутствием крови в печени. В пике I, как и в пике II, выявлена СОД активность (Рисунок 13, Б, вставка). В пике I она, по-видимому, принадлежит СОД3. Цитозольная СОД1 локализована в пике II. Самыми вероятными белками, представляющими пик III, могут быть МТ. Они характеризуются молекулярной массой ~10 кДа и высоким содержанием остатков цистеина, что хорошо согласуется с повышенным поглощением материала пика III при 254 нм.

В цитозоле Ag-N180 крыс серебро выявлено только в пике I (Рисунок 13, В). По-видимому, оно связано с ЦП. В пике II, где локализуется СОД1, серебро не выявлено. Пик III содержит медь и серебро, которые могут быть связанными с МТ. Иммунопреципитат цитозоля Ag-N180 крыс с антителами к МТ содержит медь и серебро (Рисунок 13, Г).

В отличие от содержания меди в пике IV, которое соответствует фоновому уровню, содержание серебра выше фона (Рисунок 13, В, вставка). Следует также отметить, что в этом пике выявляется неизвестный компонент, обладающий супероксиддисмутазной активностью (рибофлавин окисляющий), а также выявляемый окрашиванием Кумасси R-250 после электрофореза в неденатурирующих условиях (Рисунок 13, Е и З). В цитозоле контрольных крыс такого компонента выявлено не было (Рисунок 13, Д и Ж). Инкубация фракции #40 пика IV цитозоля Ag-N180 крыс с SDS и 2-меркаптоэтанолом при 95 °С приводит к ее распаду на компоненты, которые могут быть выявлены при окрашивании геля $AgNO_3$ (Рисунок 13, И).

Таким образом, в цитозоле клеток печени Ag-N180 крыс серебро связано с МТ и каким-то неизвестным компонентом(-ми), который проявляет СОД-подобную активность.

3.5. Сравнительная характеристика частично очищенных препаратов церулоплазмина из сыворотки крови Ag-A30 и Ag-N180 крыс

На хроматограммах сыворотки крови крыс обеих групп наибольшая часть сывороточной меди и практически все сывороточное серебро локализованы в одном пике (Рисунок 14, А и Б, см. вкладку). Этот пик соответствует фракции, содержащей ЦП.

Из сыворотки крови Ag-A30 и Ag-N180 крыс методом ионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе были получены препараты частично очищенного ЦП. По данным нативного электрофореза ЦП является основной фракцией этих препаратов (Рисунок 14, В (а) и Г (а)). Мажорная фракция ЦП из сыворотки Ag-A30 крыс элюировалась при концентрации NaCl 200 и 250 mM. При этом профиль элюции совпадал с таковым для холо-ЦП из сыворотки контрольных крыс (Рисунок 14, В (б)). Большая часть ЦП из сыворотки Ag-N180 крыс элюировалась 100 и 150 mM NaCl (Рисунок 14, Г (б)). В обоих препаратах методом иммуноблотинга выявлены две формы ЦП, отличающиеся по электрофоретической подвижности (Рисунок 14, В (б) и Г (б)), но имеющие одинаковую молекулярную массу (Рисунок 14, В (в) и Г (в)). Материал из основных фракций препаратов проявлял оксидазную и ферроксидазную активности (Рисунок 14, В (г, д) и Г (г, д)). ЦП обеих экспериментальных групп содержал медь и серебро. Общее содержание металла на молекулу ЦП составляло примерно 5 – 6 атомов. Однако содержание Ag в молекуле ЦП Ag-A30 было приблизительно в 3 раза выше, чем у Ag-N180 крыс (Рисунок 14, Д и Е).

По результатам иммуноблотинга были отобраны пробы с самой высокой концентрацией ЦП: фракция 3 (Рисунок 14, В (в)) и фракция 1 (Рисунок 14, Г (в)). Они были использованы для исследований с помощью спектроскопии поглощения и кругового дихроизма (КД) (Рисунок 14 Ж и З).

Препараты ЦП, полученные из сыворотки обеих групп Ag-крыс, характеризуются сильным снижением поглощения в полосе 610 нм и дублета в спектре КД в области 400-700 нм, характерных для меди спектрального типа I (голубой меди). Соотношение A_{610}/A_{280} в препарате ЦП Ag-N180 крыс составило 10% от соответствующего значения (0.045) для высокоочищенного ЦП, тем не менее, полоса поглощения 610 нм видна четко и имеет ту же характерную форму, что и полоса холо-ЦП. Соотношение A_{610}/A_{280} для препарата ЦП Ag-A30 крыс низкое и соответствует 1-3% от этого значения для холо-ЦП.

Спектр КД ЦП из Ag-A30 в ближней ультрафиолетовой области сильно отличается от спектров холо-ЦП и напоминает спектры частично-денатурированных состояний ЦП (*Noyer & Putnam, 1981*). Спектр КД Ag-N180-ЦП напоминает спектр белка Ag-A30 крыс, однако слегка сдвинут в сторону спектра холо-ЦП. Тем не менее, не удалось смоделировать данный спектр линейной комбинацией спектров Ag-A30-ЦП и холо-ЦП, поэтому можно заключить, что ЦП Ag-N180 крыс не является смесью Ag-A30-ЦП с дополнительным количеством холо-ЦП, а представляет собой спектрально-различный объект. Спектры КД в дальней ультрафиолетовой области также

поддерживают это заключение. На основании анализа спектров видимого диапазона и ультрафиолетовой области следует признать, что фракции ЦП сыворотки Ag-A30 и Ag-N180 крыс содержат молекулы ЦП разной конформации. Препарат ЦП Ag-N180, очевидно, содержит большее количество молекул ЦП с правильно сформированным сайтом связывания меди типа I, что согласуется с увеличением содержания меди, а также оксидазной и ферроксидазной активностей в сыворотках Ag-N180 крыс.

3.6. Некоторые свойства ЦП, циркулирующего в кровотоке Ag-N180 крыс

С помощью различных модификаций иммуноэлектрофореза был проведен сравнительный анализ сывороток крови контрольных Ag-N180 крыс по общему заряду, антигенной специфичности и составу олигосахаридных цепей.

2D-иммуноэлектрофорез показал, что в агарозном геле ЦП контрольных и Ag-N180 крыс движется одной довольно широкой зоной, которая при связывании с антителами формирует почти равнобедренный треугольник (Рисунок 15, А и Б, см. вкладку). Однако лидирующее плечо пика формируемого ЦП Ag-N180 крыс не окрашивается *o*-дианизидином (Рисунок 15, А (б)).

Перекрестный иммуноэлектрофорез (Рисунок 15, В и Г) показал, что в сыворотке крови Ag-N180 крыс есть изоформа ЦП, не проявляющая оксидазной активности, по своим антигенным свойствам не полностью идентичная холо-ЦП (Рисунок 15, Г, лунки 1 и 2). Препарат ЦП, элюированный из сыворотки крови Ag-N180 крыс 100 мМ NaCl и обладающий оксидазной активностью, по антигенным свойствам наиболее близок к препарату холо-ЦП контрольных крыс (Рисунок 15, Г, лунки 3 и 4). Фракция ЦП, элюируемая 150 и 200 мМ, по антигенным свойствам отличается от фракции ЦП этих же крыс, но элюируемой 100 мМ NaCl, и ЦП контрольных крыс (Рисунок 15, Г, лунки 5 и 6). Эти данные указывают на антигенную гетерогенность ЦП Ag-N180 крыс.

Для 2D-аффиноиммуноаффинного электрофореза были использованы следующие лектины: конканавалин – (ConA), который специфичен к α -D-маннозил и α -D-гликозил группам, агглютинин зародыша пшеницы (WGA), который специфически связывается с N-ацетил-D-глюкозамин и сиаловой кислотой, а также фитогемоглютинин красной фасоли типа P (PFP), который связывает олигосахаридные комплексы, содержащие галактозу, N-ацетилглюкозамин и маннозу.

Данные показывают, что электрофоретическая подвижность ЦП Ag-N180 крыс, который предварительно инкубировали с ConA, зависела от количественного соотношения между образцом сыворотки и ConA (Рисунок 15, Д и Е). Окрашивание гелей *o*-дианизидином и Кумасси R-250 не выявило различий, поэтому приводятся только данные окрашивания на белок. Они свидетельствуют в пользу того, что ЦП Ag-N180 крыс частично теряет остатки сиаловых кислот (Саенко и др., 1988). После инкубации с PFP ЦП контрольных крыс двигался медленнее по сравнению с ЦП Ag-N180 крыс (Рисунок 15, Ж и

3). Окрашивание гелей на белок выявляет гетерогенность олигосахаридных цепей в молекулах Ag-N180-ЦП. Преинкубация сывороток с 20 мкг WGA показала гетерогенность ЦП контрольных крыс по отношению к этому лектину (Рисунок 15, К, а ($\alpha 1$)). Видно, что минорная фракция неоксидазного ЦП имеет низкое сродство к WGA. Возможно, что это асиалированный ЦП. После связывания ЦП Ag-N180 крыс с WGA при электрофорезе в агарозном геле он распределяется в виде трех пиков (Рисунок 15, К, б (β , $\beta 1$ и $\beta 2$)), два из которых характеризуются более низким сродством к лектину. Интересно, что оксидазная и неоксидазные формы ЦП в сыворотке крови Ag-N180 крыс движутся в геле медленнее, чем ЦП контрольных животных. Эти результаты трудно интерпретировать (а) из-за отсутствия данных о полной структуре олигосахаридных цепей ЦП крыс, (б) из-за того, что лектины связываются больше, чем с одним сахаридом и (в) теория количественного взаимодействия гликан/лектин не достаточно разработана.

3.7. Скорость секреции [^{14}C]ЦП в кровотоки Ag-N180 крыс

Различия, обнаруженные в антигенных и лектин-связывающих свойствах ЦП Ag-N180 крыс, могут свидетельствовать о разном происхождении церулоплазминов, циркулирующих в кровотоке Ag-N180 крыс. У контрольных крыс [^{14}C]ЦП появляется в кровотоке через 40 мин и его количество достигает максимума через 90 мин (Рисунок 16, А, см. вкладку).

У Ag-N180 крыс иммунореактивный [^{14}C]ЦП появляется в два этапа. Так, новосинтезированный ЦП обнаруживается в кровотоке уже через 10 мин после введения метки, а через час появляется новый пик меченого ЦП. По кривой динамики секреции он совпадает с ЦП контрольных крыс. То есть, у Ag-N180 крыс, наряду с ЦП, скорость синтеза и секреции которого совпадают с ЦП печени, также синтезируется быстро секретлирующаяся форма.

Для того чтобы проверить, является ли быстро секретлируемый ЦП продуктом печени, скорость секреции *de novo* синтезированного ЦП была изучена у Ag-N180 крыс с печенью, изолированной от кровотока. В сыворотке крови интактных крыс и крыс с печенью, изолированной от кровотока, [^{14}C]белки появляются через 5 минут после введения меченых аминокислот (Рисунок 16, В). Однако общая радиоактивность сывороточных белков у крыс с печенью, изолированной от кровотока, примерно в 10 раз ниже, чем у интактных.

У крыс с изолированной от кровотока печенью новосинтезированный ЦП точно не появляется в кровотоке через 50 мин после введения меченых аминокислот (Рисунок 16, Б). В то же самое время у контрольных крыс следы меченого ЦП появляются через 30 мин и его количество нарастает время-зависимо. У Ag-N180 крыс [^{14}C]ЦП появляется уже через 10 мин (Рисунок 16, В).

Данные однозначно показывают, что у Ag-N180 крыс в крови циркулируют две формы ЦП: печеночного и не печеночного происхождения. Так как поступление крови от кишечника также изолировано, он не может быть продуктом клеток кишечника.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что у взрослых крыс (Ag-A30) Ag-диета вызывает избирательное накопление серебра в печени, что приводит к включению серебра в ЦП, тем самым создавая дефицит меди в сыворотке крови животных. У крыс, которые начали получать серебро с первого дня после рождения на фоне еще действующего в их организме эмбрионального типа метаболизма меди, индуцируются внепеченочный синтез и секреция ЦП, который обеспечивает потребности растущего организма в меди.

Полученные в работе данные отчетливо показывают, что серебро включается в ЦП и блокирует формирование функциональных активных центров. В то же время, серебро не включается в СОД1 (вероятнее всего, и в СОД3) и не влияет на его активность. Этот факт можно объяснить, если взять во внимание разницу между активными центрами этих купроэнзимов и теорию жестких и мягких кислот и оснований (HSAB принцип Пирсона). В активных центрах обеих супероксиддисмутаз (таблица 2) атомы меди координируются только остатками гистидина, которые являются донорами электронов средней жесткости и хорошими лигандами для Cu(II). Однако они не так хороши в случае стабилизации ионов Ag(I), которые являются мягким акцептором.

Таблица 2

Аминокислоты (аминокислотные остатки), участвующие в координации меди в активных центрах церулоплазмينا, СОД1 и СОД3 (по данным рентгеноструктурного анализа)

Фермент	PDB ID	Ион меди	Аминокислоты – доноры радикалов, координирующих медь
СОД 1, человек	1HL5	Cu	H46, H48, H63 и H120; геометрия тетраэдра (tetrahedral geometry)
СОД 3, человек	2JLP	Cu	H96 и H98
ЦП*, человек	1KCW, 2J5W	Cu21 (голубая)	H276, C319, H324
		Cu41 (голубая)	H637, C680, H685
		Cu42 (лабильная)	D684
		Cu61 (голубая)	H975, C1021, H1026
		Cu62 (лабильная)	H940, D1025
		Cu31	H163, H980, H1020, [кислород]
		Cu32	H103, H161, H1022, [кислород]
Cu34	H101, H978, H980, [кислород]		

*Церулоплазмин может содержать до 8 атомов меди, 2 из которых лабильны. Данные по сайтам связывания меди, представленные в таблице (аминокислотные остатки и нумерация атомов меди) даны по PDB.

Тринуклеарный центр ЦП, являясь окислительно-восстановительным сайтом, также содержит только остатки гистидина. В то же время, молекула ЦП имеет 3 сайта голубой меди, каждый из них содержит ключевой остаток цистеина. Цистеин является мягким донором, который хорошо стабилизирует как Cu(I) так и Ag(I), что хорошо используется Cu(I)-шаперонами. Процесс

передачи меди в состоянии Cu(I) из гистидиновых сайтов шаперона, так или иначе, связан с окислением ее до Cu(II). Однако, в случае Ag(I) этот процесс не представляется возможным (Рисунок 17, см. вкладку). Таким образом, серебро не может быть вставлено в молекулы супероксиддисмутаза и, следовательно, эти купроэнзимы не инактивируются. Цистеин содержащие сайты ЦП могут принять серебро, однако оно не может окислиться, что приводит к потере ферментативной активности ЦП.

ВЫВОДЫ

1. У взрослых крыс, получавших Ag-диету в течение месяца (Ag-A30 крысы), практически исчезает (ферр)оксидазная активность и резко падает концентрации меди в сыворотке крови. У Ag-A30 крыс серебро селективно накапливается в печени, в клетках печени оно аккумулируется в митохондриях. Ионы серебра достигают люминального пространства аппарата Гольджи и включаются в молекулу ЦП. Вследствие этого ЦП теряет (ферр)оксидазную активность, нарушается укладка его полипептидной цепи. Уровень зрелых транскриптов генов МСМ не меняется.
2. Ионы серебра, получаемые с молоком матери в первые 23 дня жизни, переносятся по тем же межорганным и внутриклеточным маршрутам, что и медь. Они накапливаются в печени, но не влияют на показатели метаболизма меди. Смена эмбрионального типа метаболизма меди на взрослый тип у Ag-N23 крыс происходит так же, как и у контрольных крыс на 13-й день жизни.
3. У крыс, получавших ионы серебра с первого дня жизни в течение 6 месяцев (Ag-N180 крысы), показатели статуса меди, по сравнению с контрольными крысами, снижаются только в 2 раза. Накопление серебра в клетках Ag-N180 крыс не превышает таковое у Ag-A30, но в межклеточных пространствах обнаруживаются включения серебра. В клетках печени Ag-N180 крыс серебро аккумулируется в цитозоле, где входит в состав металлотионеинов и неидентифицированного комплекса низкомолекулярных веществ. Относительный уровень генов, ассоциированных с транспортом меди, достоверно снижается.
4. У Ag-N180 крыс в кровотоке циркулируют, по крайней мере, две изоформы ЦП, которые отличаются по сродству к ДЕАЕ-Сефарозе, лектин-связывающим свойствам, скорости секреции в кровотоки. Одна из них не является белком печени.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Частичная характеристика церулоплазмينا крысы, выделенного из сыворотки крови животных, получавших с пищей соли серебра / А.Н. Скворцов, Е.Ю. Ильичева, Е.А. Затуловский [и др.] // Цитология. — 2010, — Т. 52, №11. — С. 70-76.

2. Experimental switching of copper status in laboratory rodents / **Е.Ю. Пычева**, A.N. Skvortsov, E.A. Zatulovsky [et al.] // Journal of trace elements in medicine and biology. — 2011. — V. 25, №1. — P. 27—35.
3. Развитие лабораторных крыс, длительное время получавших с кормом соли серебра / **Е.Ю. Ильичева**, В.В. Баришполец, Н.В. Цымбаленко, Л.В. Пучкова, Н.С. Сапронов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2012 — Т. 153, № 3. — С. 359 — 365.
4. Serum depletion of holo-ceruloplasmin induced by silver ions in vivo reduces uptake of cisplatin / E.A. Zatulovskiy, A.N. Skvortsov, P. Rusconi, **Е.Ю. Пычева**, P.S., Babich, N.V. Tsymbalenko, M. Broggin, L.V. Puchkova // J. Inorg. Biochem. — 2012. — V. 116. — P. 88—96.
5. The model to study effects of blood serum copper deficiency on d-element metabolism in liver and brain of rodents / E.A. Zatulovskiy, A.N. Skvortsov, N.V. Tsymbalenko, P.S. Babich, **Е.Ю. Пычева**, M.M. Shavlovsky, M. Broggin, L.V. Puchkova // Abstract book of 38th International Conference on Coordination Chemistry (Jerusalem, Israel, July, 2008). - P. 310.
6. Распределение микроэлементов и экспрессия генов Cu-транспортных белков и купрозиназ в печени мышей, получавших ионы Ag / Е.А. Затуловский, **Е.Ю. Ильичева**, А.Н. Скворцов [и др.] // Сборник материалов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (11-15 мая 2008 г., Новосибирск). – 2008 - С. 448.
7. Затуловский, Е.А. Участие метаболической системы меди в поступлении ионов серебра в организм лабораторных мышей / Затуловский Е.А., **Ильичева Е.Ю.** // Сборник тезисов 12-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века» (10-14 ноября 2008 г., Пущино-на-Оке). – 2008. - С. 87.
8. Экспрессия гена CTR1, кодирующего высокоаффинный импортер меди, в органах крыс при различных состояниях обмена меди / С.А. Самсонов, А.Н. Скворцов, Е.А. Затуловский, П.С. Бабич, **Е.Ю. Ильичева**, Н.В. Цымбаленко, Л.В. Пучкова // Материалы Пятого съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГИС) (21-28 июня 2009, Москва). – 2009. - С. 88.
9. **Ильичева Е.Ю.** Онтогенетические изменения метаболизма меди в печени и мозге лабораторных грызунов / **Е.Ю. Ильичева**, Е.А. Затуловский // Сборник тезисов 13-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века» (28 сентября - 2 октября 2009 г., Пущино-на-Оке). – 2009. - С. 70.
10. **Ильичева Е.Ю.** Создание животной модели с восстанавливающимся статусом меди / **Е.Ю. Ильичева**, Е.А. Затуловский // Сборник тезисов 14-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука 21 века» (19-23 апреля 2010 г., Пущино-на-Оке). – 2010. - С. 27.
11. **Ильичева, Е.Ю.** Влияние пищевого серебра на метаболизм меди у млекопитающих / Е.Ю. Ильичева, Н.В. Цымбаленко, Л.В. Пучкова // Материалы VI Съезда Российского общества Медицинских генетиков (15-18 мая 2010 г., Ростов-на-Дону). – 2010. - С. 75
12. Influence of ceruloplasmin-associated copper deficiency on copper metabolism in mammals / E. Zatulovsky, **Е. Пычева**, L. Puchkova [et al.] // Trace elements in medicine. Special issue. 4th International FESTEM Symposium on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology (June 9-12, 2010, St. Petersburg, Russia). – 2010. - Vol. 11, №2. - P. 32.
13. A single injection of copper sulphate restores oxidase activity in blood serum of mammals fed by fodder with silver ions/ **Е. Пычева**, A. Skvortsov, N. Tsymbalenko [et al.] // Trace elements in medicine. Special issue. 4th International FESTEM Symposium on Trace Elements and Minerals in Medicine and Biology (June 9-12, 2010, St. Petersburg, Russia). – 2010. - Vol. 11, №2. - P. 24.
14. Отдаленные последствия дефицита меди, спровоцированного ионами серебра / Л.В. Пучкова, **Е.Ю. Ильичева**, Н.В. Цымбаленко [и др.] // Материалы XXI Съезда

- Физиологического общества им. И.П. Павлова (19-25 сентября 2010, г. Калуга). – 2010. - С. 508.
15. Цымбаленко, Н.В. Применение модели “Лактирующая самка - новорожденные” при изучении влияния пищевого серебра на метаболизм меди у крыс / Н.В. Цымбаленко, **Е.Ю. Ильичева**, П.С. Бабич, Л.В. Пучкова // Материалы XXI Съезда Физиологического общества им. И.П.Павлова (19-25 сентября 2010, г. Калуга). – 2010. - С. 665.
 16. In vivo model for studying the role of copper in the development of the skeletal system of mammals / **Е.У. Pyechova**, A.N. Skvortsov, P.S. Babich [et al.] // 11th International Symposium on Metal ions in Biology and Medicine Metal ions in biology and medicine (20th-23rd June 2011, Cambridge, UK). – 2010. - P.105.
 17. Оценка возможности использования грызунов со сниженным статусом меди как модели ацерулоплазминемии – врожденной ошибки метаболизма железа / **Е.Ю. Ильичева**, А.Н. Скворцов, Е.С. Петрова [и др.] // 16-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21 века» (16 - 21 апреля 2012 г., г. Пушино-на-Оке). – 2012. – С. 176-177.
 18. **Pyechova, E.** Changes of expression of copper associated genes in adrenal glands during development // E. Pyechova, Y. Vasilenko, A.Skvortsov, N. Tsymbalenko, L. Puchkova./ 8th International Copper Meeting “Copper in Biology” (30 September – 5 October, 2012, Alghero, Italy). - 2012. - P. 59.
 19. **Pyechova E.** Copper metabolism in mammals during long-term influence of silver ions / E. Pyechova, A. Skvortsov, N. Tsymbalenko // 13th Young Scientists Forum FEBS (3-6 July, 2013, Saint-Petersburg, Russia). - 2013. P.
 20. **Pyechova E.** Influence of long-term ceruloplasmin-associated copper deficiency on copper metabolism in rats / E. Pyechova, A. Skvortsov, N. Tsymbalenko, L. Puchkova // 4th International Symposium on Metallomics (8-11 July, 2013, Oviedo, Spain). - 2013. - P. 153.

Работа поддержана грантами РФФИ 09-04-01165-а, 09-04-01406-а, 11-04-09445-моб_з, 12-04-09566-моб_з, 12-04-31518 мол_а

СОКРАЩЕНИЯ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В ТЕКСТЕ АВТОРЕФЕРАТА

Ag-диета (Ag-корм) – стандартный корм, содержащий AgCl из расчета 50 мг/1 кг массы тела
Ag-животные – животные, получающие Ag-корм
Ag-A30 – взрослые животные, получающие Ag-корм в течение месяца
Ag-N5, 10, 20, 40, 180 - животные, получающие Ag-корм с рождения в течение 5, 10, 20, 40, 180 дней, соответственно
FAAS – беспламенная атомная абсорбционная спектроскопия
PDB (Protein Data Bank) — база данных 3-D структур белков и нуклеиновых кислот
per os – перорально
МСМ – метаболическая система меди
МТ – металлотioneин
ЦП – церулоплазмин

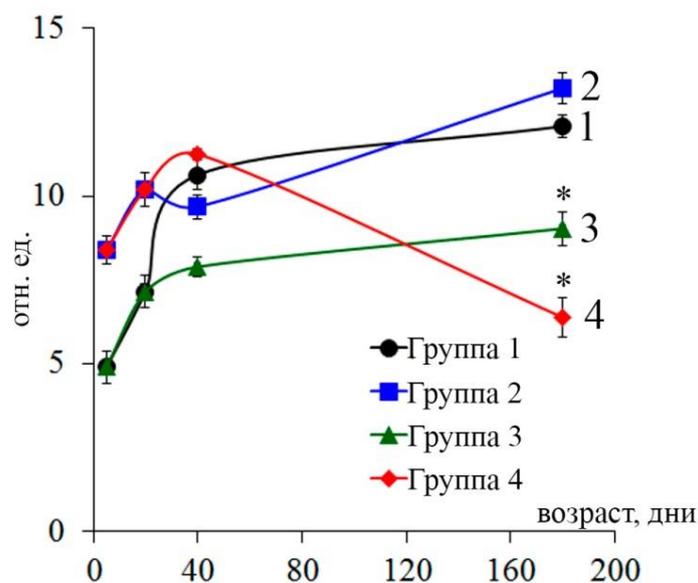


Рисунок 5. Изменение оксидазной активности у крыс групп 1 - 4 в течение развития.

*: $p < 0.05$ по сравнению с группой 1.

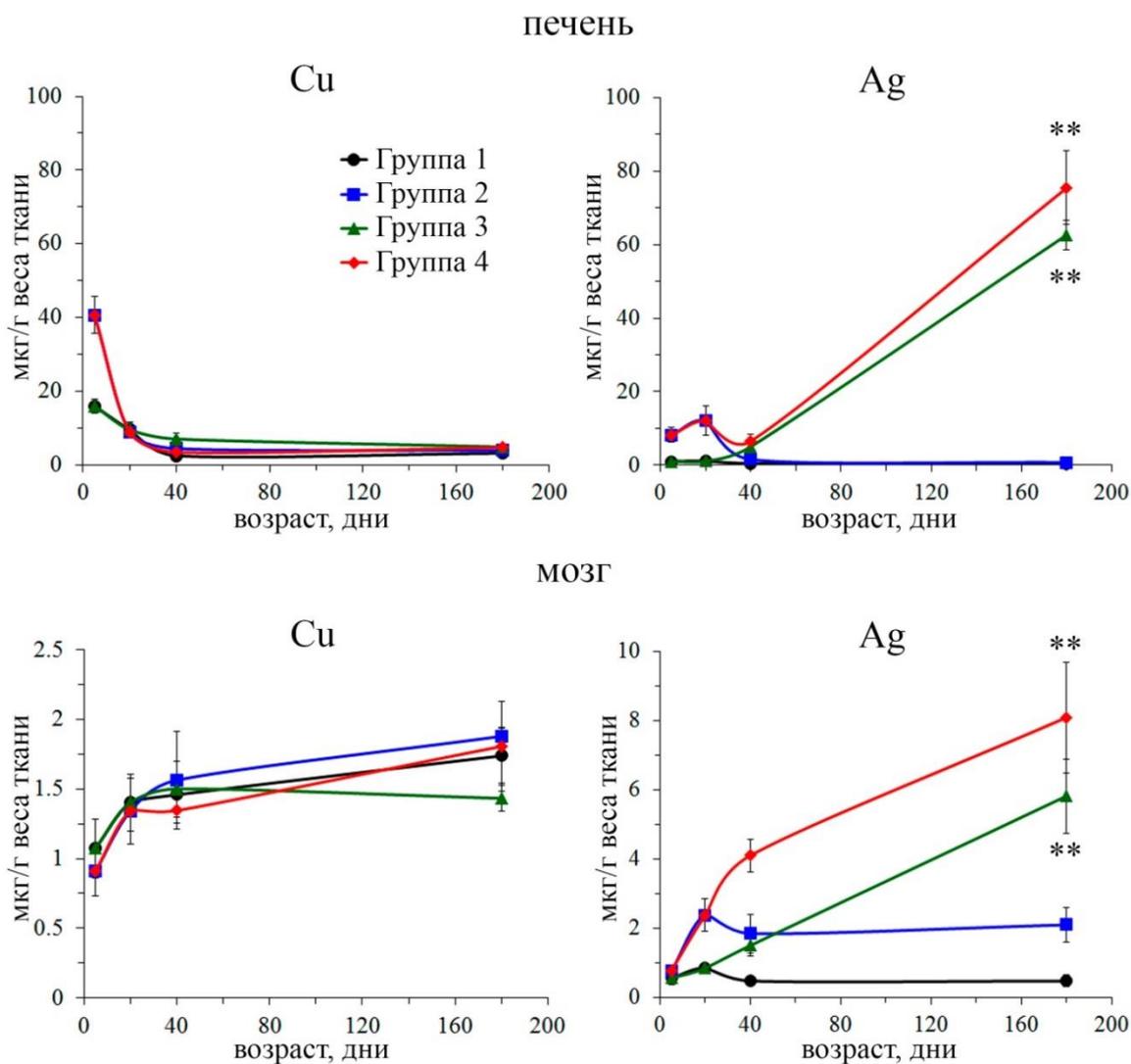


Рисунок 6. Изменение содержания меди и серебра в печени и мозге развивающихся крыс.

** : $p < 0.01$ по сравнению с группой 1.

Таблица 1

Влияние Ag-диеты на исследуемые биохимические и физиологические показатели у Ag-крыс

Показатели	Группы животных		
	Контроль	Ag-A30	Ag-N180
Сыворотка крови			
[Cu], мкг/л (<i>n</i> =10)	1306 ± 100	120 ± 10 ↓	981 ± 28
[Ag], мкг/л (<i>n</i> =10)	-	2052 ± 213	1500 ± 243
*[Ср] белок, мг/дл (<i>n</i> =10)	65±7	58±5	60±8
**Оксидазная активность, мг/дл (<i>n</i> =10)	38,5 ± 3.4	1.70 ± 0.51 ↓	20.0 ± 0.7 ↓
***Ферроксидазная активность, у.е. (<i>n</i> =10)	0.70 ± 0.16	0.02 ↓	0.49 ± 0.10
СОД3 активность, ед.а. (<i>n</i> =5)	68 ± 19	112 ± 40	155 ± 55
Гемоглобин, г/л (<i>n</i> =10)	172 ± 21	168 ± 15	175 ± 30
Физиологические показатели (<i>n</i>=11)			
Возраст половой зрелости, дни	60-70	60-70	60-70
Плодовитость, число крысят в помете	10±2	0	3±1 ↓
Жизнеспособное потомство	90%	0%****	90%
Индекс масса тела/масса органа			
Печень	32 ± 5	НО	29 ± 3
Мозг	32 ± 5	НО	29 ± 7
Сердце	335 ± 19	НО	259 ± 17
Почки	149 ± 9	НО	132 ± 7
Легкие	193 ± 26	НО	131 ± 46
Селезенка	340 ± 26	НО	272 ± 30
Тест “открытое поле”			
-движение, секторов	29 ± 2	НО	30.0 ± 2.9
-вставание, раз	8.4 ± 0.2	НО	5.8 ± 0.8
-обследованные норки, кол-во	2.9 ± 0.8	НО	1.9 ± 0.5
-груминг, раз	1.4 ± 0.4	НО	2.6 ± 0.7
-дефекация, раз	1.6 ± 0.2	НО	0
Тест “УРПИ”	142 ± 10	НО	180 ± 9

* - определено методом ракетного иммуноэлектрофореза.

** - определено с помощью *para*-фенилендиамина.

*** - колориметрическое измерение в геле.

**** - данные Шавловский и др., 1995.

НО – не определяли

↓ - изменения достоверны по сравнению с контролем

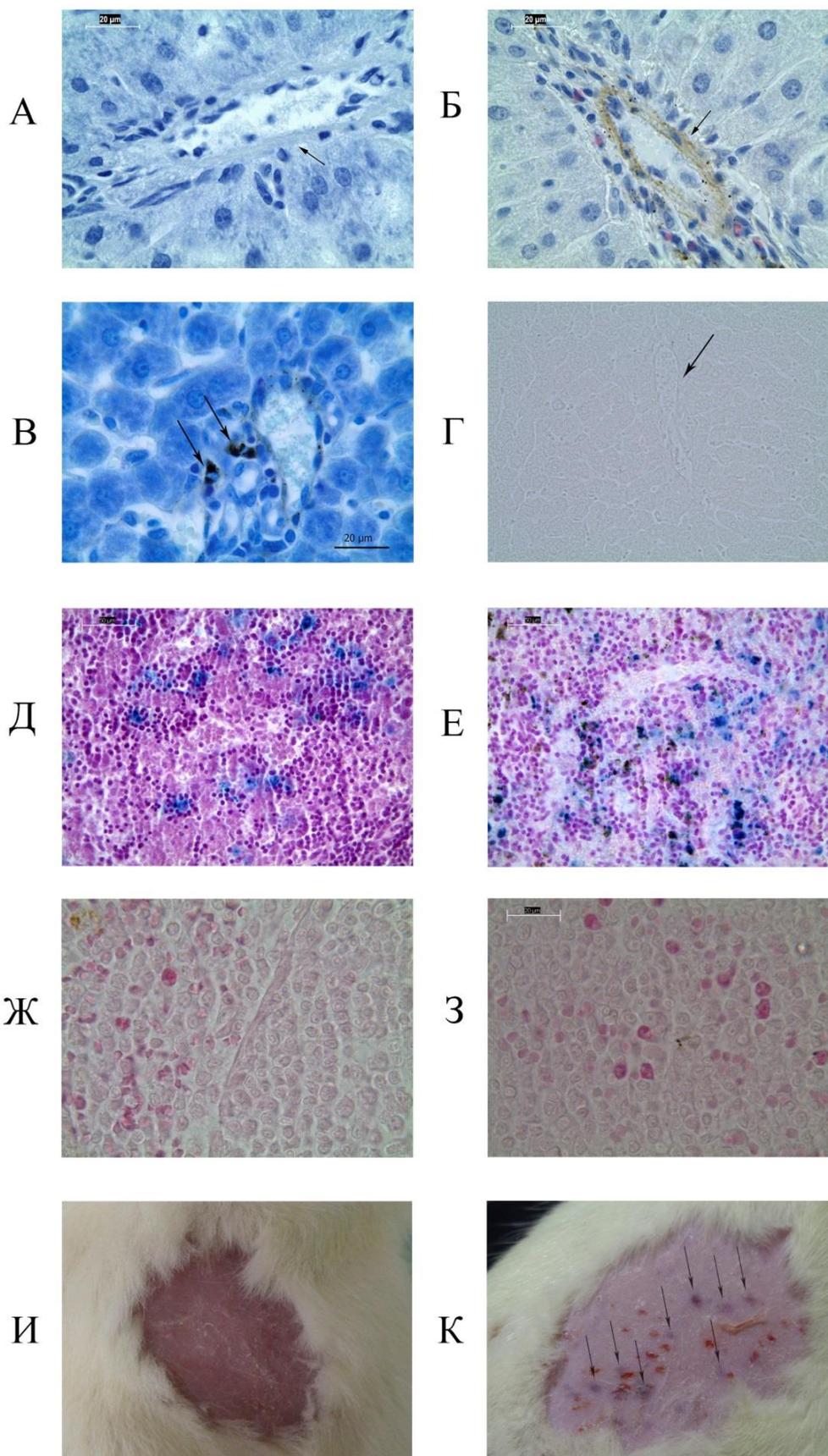


Рисунок 10. Сравнительный гистологический анализ срезов печени и селезенки Ag-A30 и Ag-N180 крыс.

А, Б, Г - печень, стрелками обозначены стенки сосудов; **В** – печень, стрелками обозначены макрофаги; **Д, Е, Ж, З** – селезенка; **И** и **К** - Инфильтраты в коже (обозначены стрелками). Пятна, не отмеченные стрелками – травмы после выщипывания шерсти (наблюдали у всех крыс этой группы, которых подвергли выщипыванию шерсти).

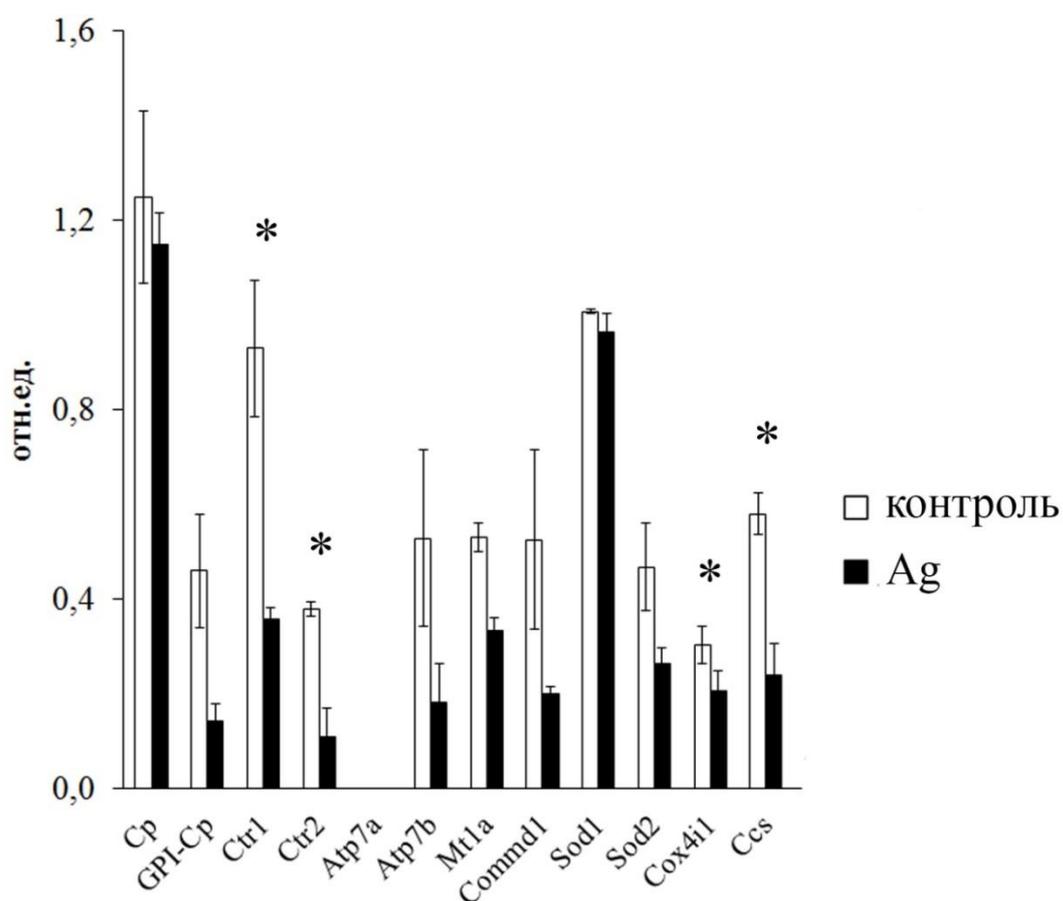


Рисунок 11. Транскрипционная активность генов медьтранспортных белков и купроэнзимов в печени контрольных и Ag-крыс.

*: $p < 0,05$.

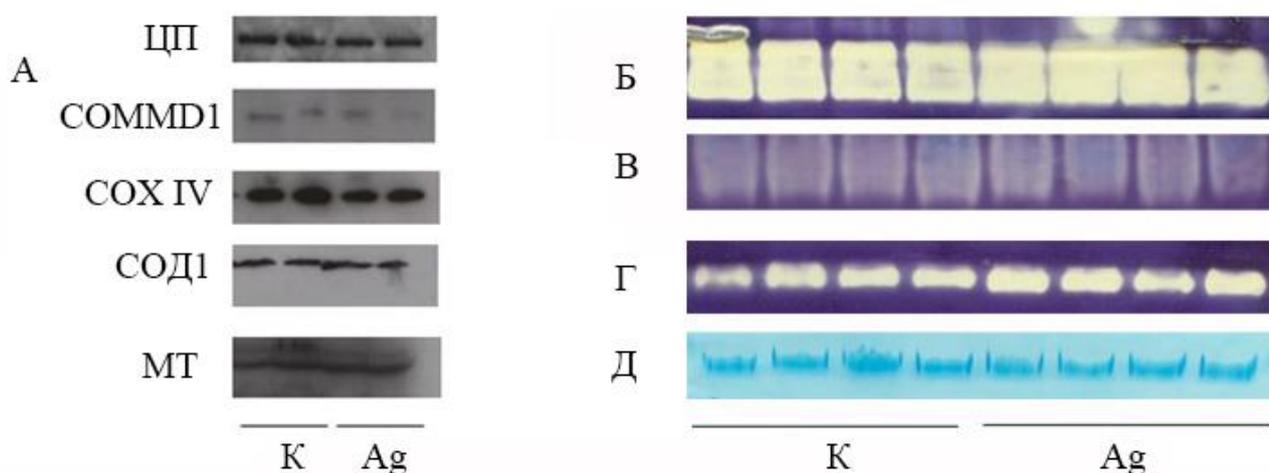


Рисунок 12. Относительное содержание и активность медьтранспортных белков и купроэнзимов в клетках печени контрольных и Ag-N180 крыс.

А – иммуноблотинг церулоплазмينا (1 мкл сыворотки крови на дорожку); COXIV в митохондриях (20 мкг белка на дорожку) и СОД1 в цитозоле (30 мкг белка на дорожку); COMMD1 (40 мкг белка на дорожку) и МТ (50 мкг белка на дорожку) в цитозоле; **Б, В, Г** – ферментативная активность СОД1 в цитозоле, митохондриях и в цитозоле, соответственно (100 мкг белка на дорожку); **Д** – содержание железа в ферритине (цитозоль печени, 150 мкг белка на дорожку).

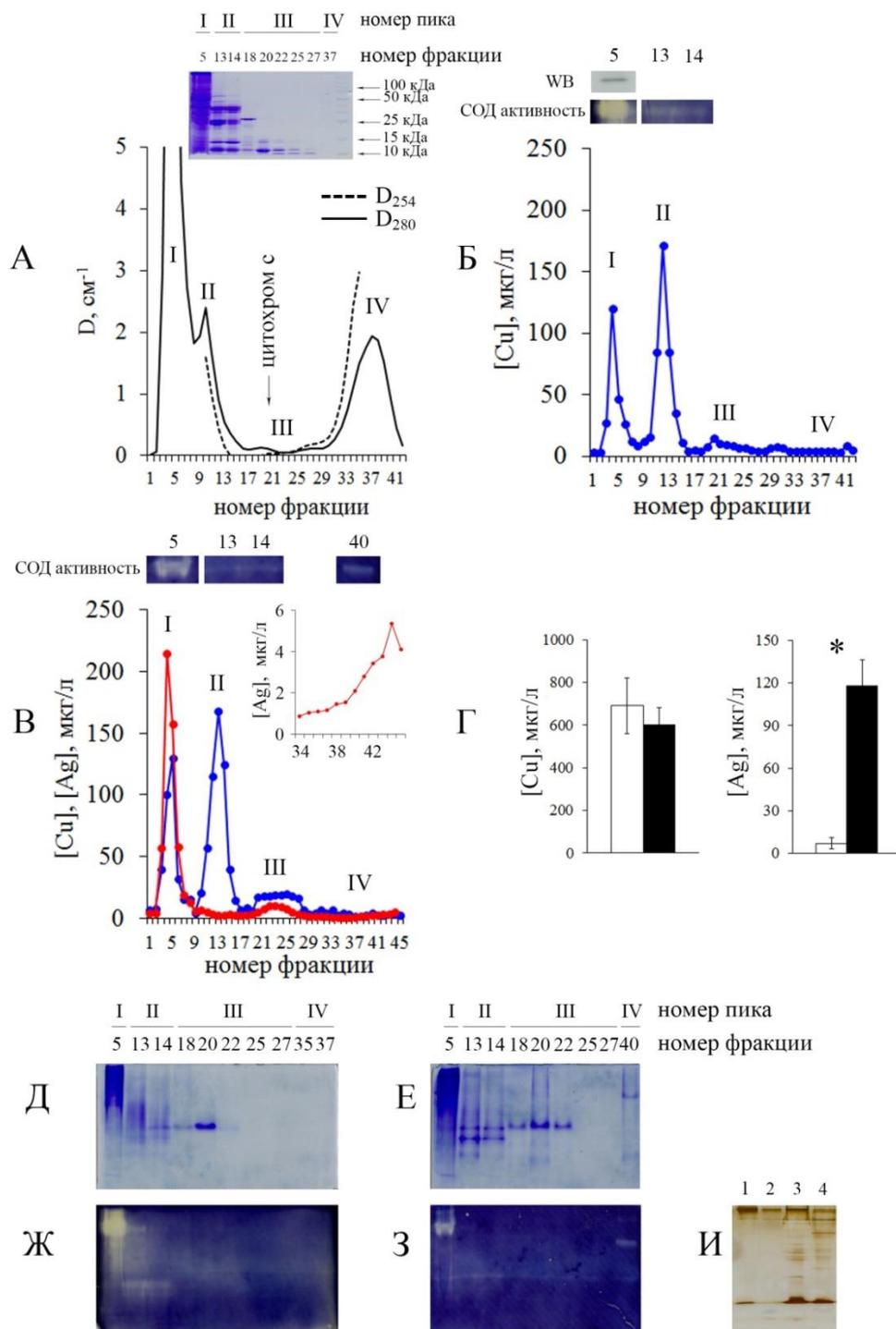


Рисунок 13. Распределение Cu и Ag в цитозоле печени контрольных и Ag-N180 крыс.

А - Профиль элюции белков цитозоля на колонке с Сефадексом G-75. Вставка - SDS-ПААГ электрофорез фракций. **Б** - Профиль распределения меди в цитозоле печени контрольных крыс. Вставка: иммуноблотинг с антителами к ЦП и СОД активность. **В** - Профиль распределения меди (синий) и серебра (красный) в цитозоле печени Ag-N180 крыс. Вставка: СОД активность и пик IV в увеличенном масштабе. **Г** - содержание меди и серебра, ассоциированных с металлотioneином. □ - контрольные крысы, ■ - Ag-N180 крысы. *: $p < 0,05$. **Д**, **Е** - Неденатурирующий электрофорез в 10% ПААГ фракций контрольных и Ag-N180 крыс, соответственно. **Ж** и **З** - выявление ферментативной активности СОД в тех же фракциях. **Ж** - контроль, **З** - Ag-N180 крысы; **И** - Электрофорез в 12% SDS-ПААГ фракций пика IV контрольных #37 (1, 2) и Ag-N180 #40 (3, 4) крыс. Образцы были инкубированы с SDS и 2-ME в течение 5 минут при 95 °C (1, 3) или при комнатной температуре (2, 4).

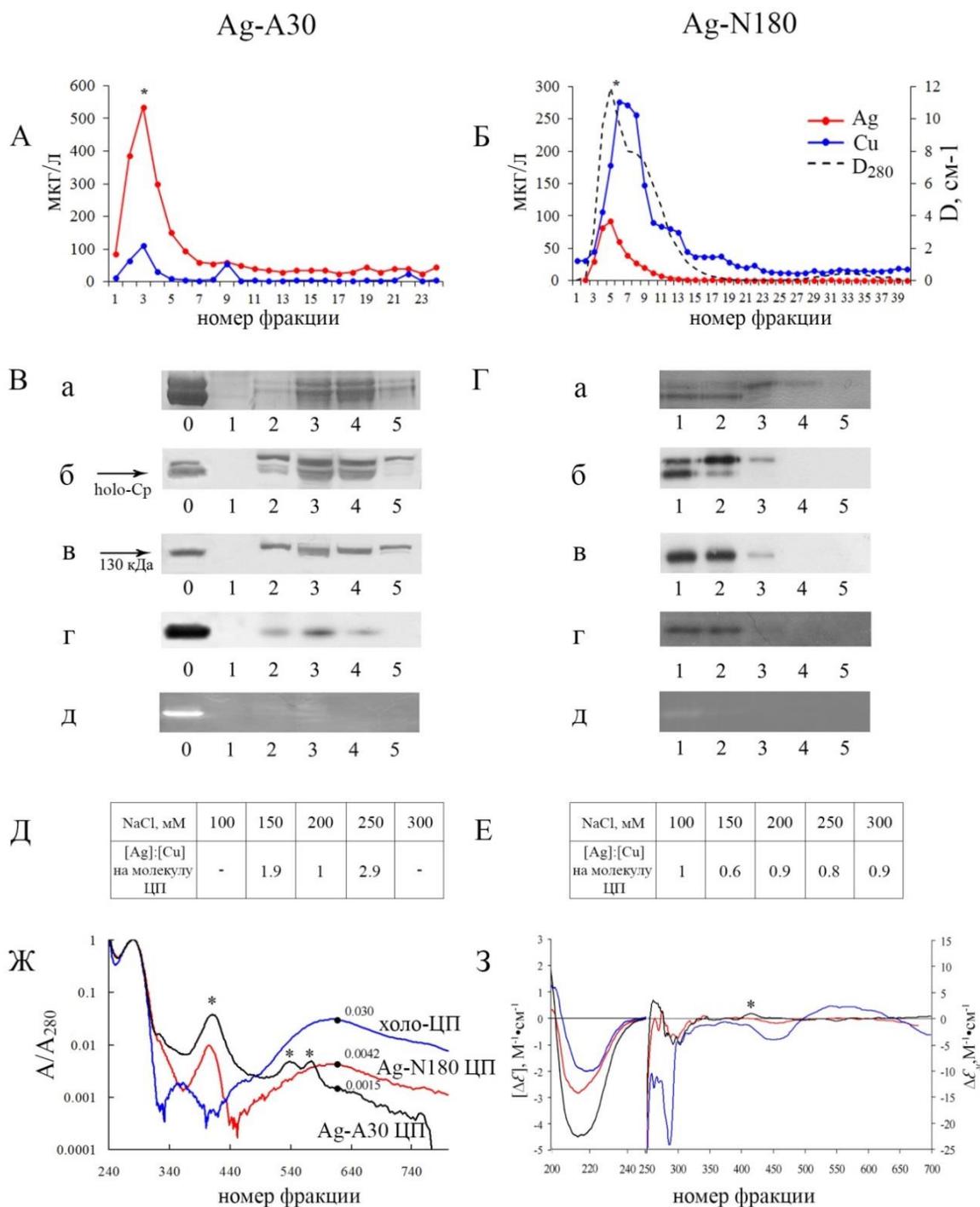


Рисунок 14. Характеристика частично очищенных препаратов

церулоплазмينا из сыворотки крови контрольных, Ag-A30 и Ag-N180 крыс.

А и **Б**: Распределение меди и серебра в сыворотках крови Ag-A30 и Ag-N180 крыс, соответственно. **В** и **Г**: Характеристика хроматографических фракций церулоплазмينا Ag-A30 и Ag-N180 крыс, соответственно. **0** – ЦП контрольных крыс, **1–5** – фракции Ag-ЦП, элюированные соответственно концентрациями NaCl, равными 100, 150, 200, 250 и 300 мМ. **а** – ПААГ после неденатурирующего электрофореза окрашен на общий белок; **б** – Иммуноблотинг с антителами к ЦП тех же фракций; **в** – То же, электрофорез проведен в денатурирующих условиях; **г** и **д** – оксидазная и ферроксидазная активности, соответственно, в ПААГ в неденатурирующих условиях). **Д** и **Е** - Молярные отношения концентраций меди и серебра в элюированных фракциях церулоплазмينا. **Ж** и **З** - Спектры поглощения и кругового дихроизма фракций ЦП, соответственно. Красная линия – фракция 1 из сыворотки крови Ag-N180 крыс; черная линия - фракция 3 из сыворотки крови Ag-A30; синяя линия – ЦП, выделенный из сыворотки крови контрольных крыс. Звездочки указывают пики следовых примесей гемоглобина.

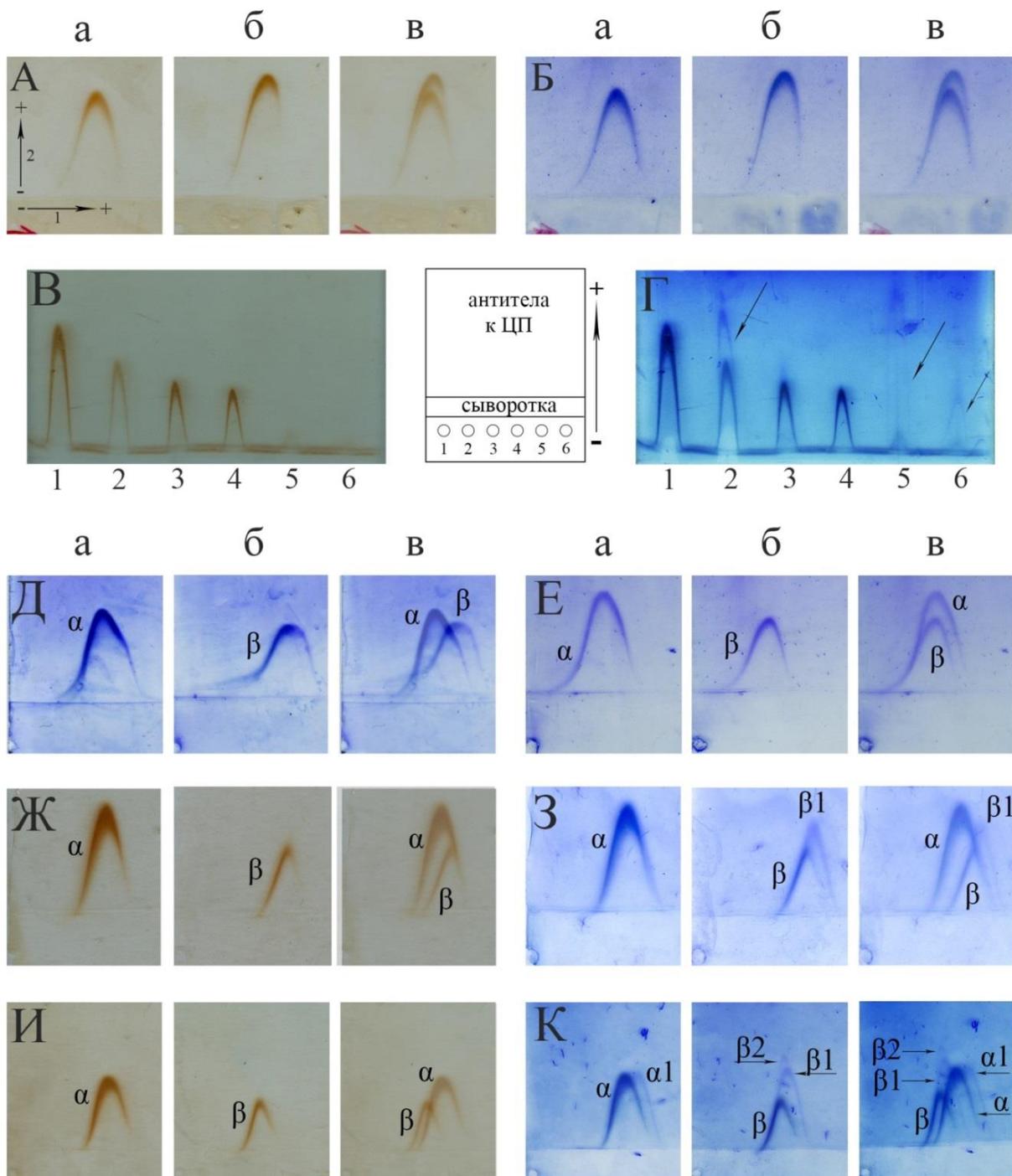


Рисунок 15. Некоторые свойства Ag-N180-ЦП.

А и Б - 2D-иммуноэлектрофорез сывороток крови контрольных и Ag-N180 крыс. Гели окрашены *o*-дианизидином (А), те же гели окрашены Кумасси R-250 (Б). **а** – контрольные крысы, **б** - Ag-N180 крысы, **в** - совмещенные изображения. **В и Г** - Перекрестный иммуноэлектрофорез сывороток крови контрольных и Ag-N180 крыс. В середине – схема проведения перекрестного иммуноэлектрофореза. Образцы: **1** – 1,5 мкл сыворотки контрольных крыс, **2** - 1,5 мкл сыворотки Ag-N180-крыс, **3** – 0.05 мкл 250 мМ NaCl фракции холо-ЦП, **4** – 1 мкл 100 мМ NaCl фракции ЦП сыворотки Ag-N180-крыс, **5** - 5 мкл 150 мМ NaCl фракции ЦП сыворотки Ag-N180-крыс, **6** - 5 мкл 200 мМ NaCl фракции ЦП сыворотки Ag-N180-крыс. Стрелки указывают зоны, окрашиваемые Кумасси R-250. **Д - К** - 2D-аффинноиммуноэлектрофорез сывороток крови контрольных и Ag-N180 крыс. Греческие буквы обозначают зоны иммунопреципитации. Сыворотки крови предварительно инкубировали (**Д**) с 40 мкг ConA, (**Е**) 80 мкг ConA; (**Ж и З**) со 120 мкг PFP; (**И и К**) с 20 мкг WGA на 1 мкл сыворотки. Инкубацию проводили в течение 16 ч при +6 °С.

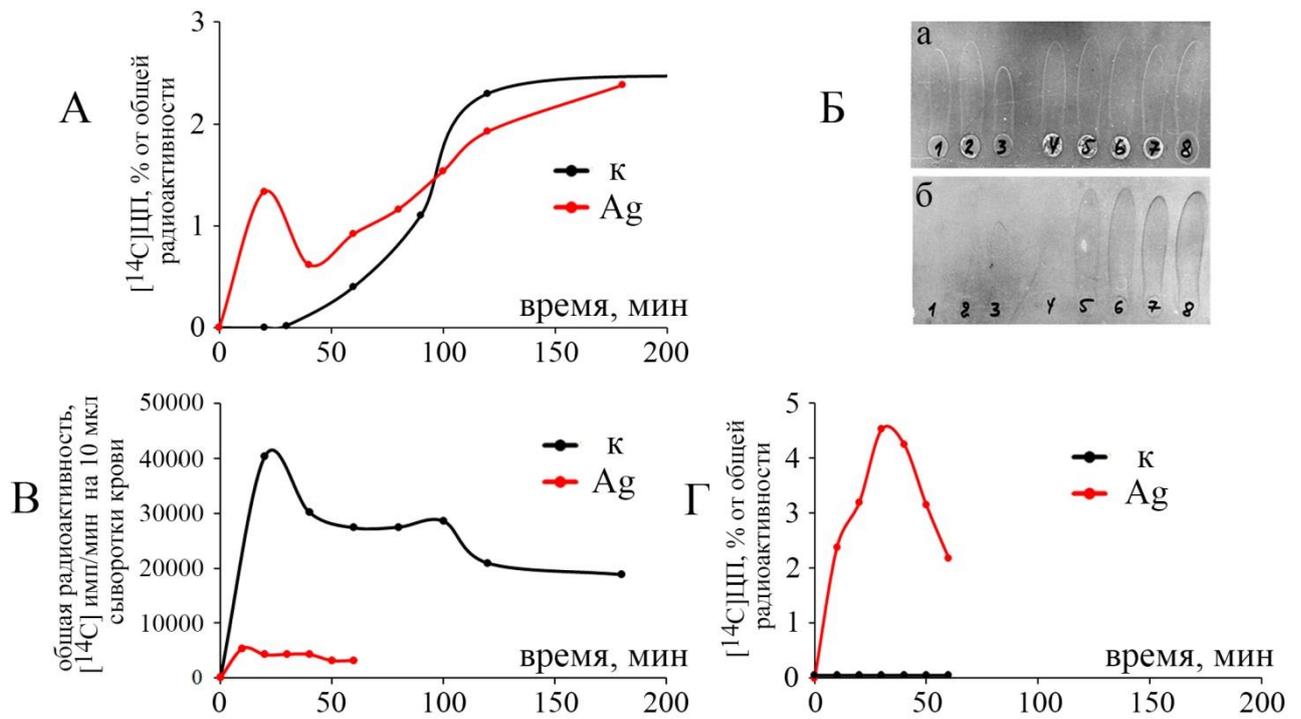


Рисунок 16. Секреция $[^{14}\text{C}]$ ЦП в кровотоке контрольных и Ag-N180 крыс. **А** - Секреция $[^{14}\text{C}]$ ЦП в кровотоке контрольных и Ag-N180 крыс. **Б** - Секреция $[^{14}\text{C}]$ ЦП у контрольных крыс после исключения печени от кровотока. 25 мкл сыворотки подвергали ракетному иммуноэлектрофорезу. **а** – регистрация зон преципитации по мутности. **б** – радиоавтограф того же геля. **Лунки 1-3:** печень исключена от кровотока, через 40, 50 и 60 минут после введения $[^{35}\text{S}]$ метионина, соответственно. **Лунки 4-8:** интактные крысы, через 30, 40, 50, 60 и 75 минут после введения $[^{35}\text{S}]$ метионина, соответственно. **В** - Секреция $[^{14}\text{C}]$ белков в кровотоке контрольных крыс и крыс с печенью, изолированной от кровотока. **Г** - Секреция $[^{14}\text{C}]$ ЦП в кровотоке Ag-N180 крыс с изолированной печенью.

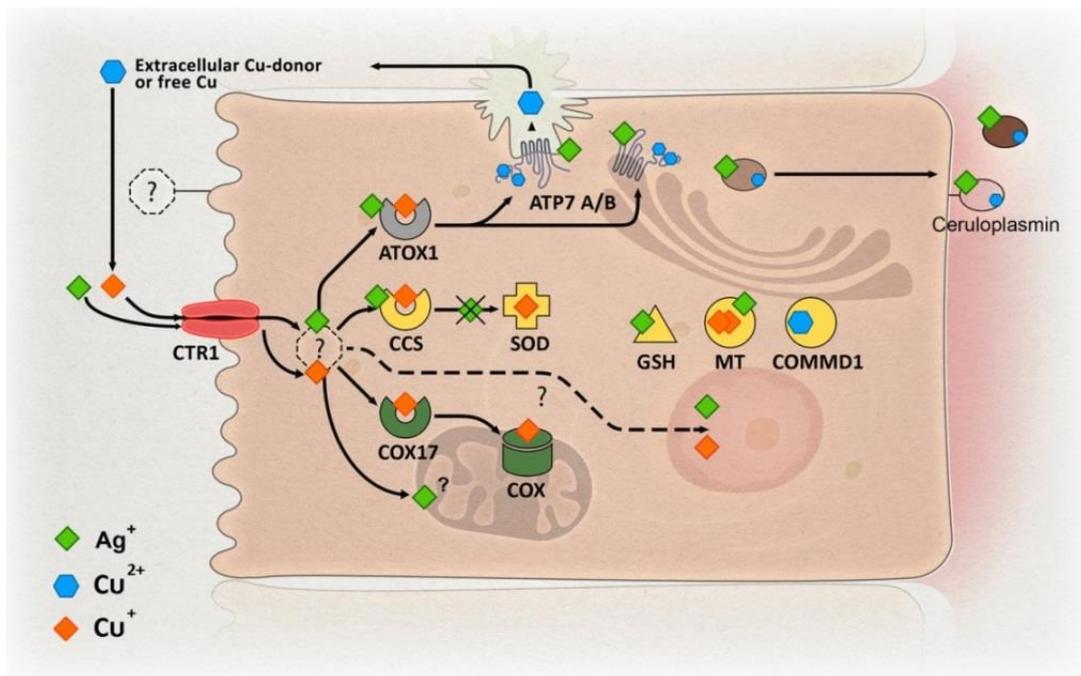


Рисунок 17. Предполагаемый механизм вмешательства серебра в метаболизм меди.