

На правах рукописи

СКОМОРОХОВА

Екатерина Александровна

**МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА
МЕТАБОЛИЗМ МЕДИ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ, СВЯЗЬ МЕЖДУ ИХ
БИОАКТИВНОСТЬЮ, РАЗМЕРОМ И ФОРМОЙ**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2020

Работа выполнена на факультете лазерной фотоники и оптоэлектроники
ФГАОУВО «Национальный исследовательский университет ИТМО»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Ильичева Екатерина Юрьевна

Официальные оппоненты: Королев Дмитрий Владимирович,

доктор химических наук, заведующий НИЛ нанотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Петросян Мария Анатольевна,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы фармакологии Отдела патоморфологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «15» декабря 2020 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.127.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН по адресу: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д.44, тел. (812)552-79-01, электронная почта office@iephb.ru, сайт <http://www.iephb.ru>.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44), а также на сайте ИЭФБ РАН <http://www.iephb.ru/nauka/dissovet/>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 002.127.01
доктор биологических наук



Р.Г.Парнова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень ее разработанности. Наночастицы серебра (AgNPs), благодаря антибактериальным свойствам, являются самыми используемыми металлическими наночастицами. Это свойство обеспечило им широкое применение в пищевой и текстильной промышленности, в медицине, косметике и других областях. Разрабатываются подходы для использования AgNPs в качестве лекарственных препаратов, которые могут помочь преодолеть устойчивость бактерий к антибиотикам (*Markowska et al., 2013*), подавлять рост опухолей (*Li et al., 2018*) и замедлять развитие нейродегенеративных заболеваний (*Rai et al., 2016; Youssif et al., 2019; Hecel et al., 2019*). В то же время увеличение частоты прямых контактов человека с AgNPs остро ставит вопрос об их потенциальной опасности. Немногочисленные исследования влияния AgNPs *in vivo* на млекопитающих направлены на оценку их токсического действия, в том числе установление концентраций AgNPs, при которых обнаруживаются драматические изменения в системах репарации, репликации, антиоксидантной защиты (*McShan et al., 2014; Liao et al., 2019*). Токсическое действие электронейтральных AgNPs объясняют тем, что в организмах они подвергаются химическим модификациям, продуктами которых являются активные формы кислорода (АФК) и ионы серебра Ag(+). АФК провоцируют развитие окислительного стресса, который вызывает онкологические, нейродегенеративные и сердечно-сосудистые заболевания. Для такого сценария требуются AgNPs в концентрации примерно 50 мг/кг массы тела (*Moradi-Sardareh, 2018*). С такими концентрациями AgNPs человек, возможно, столкнется при техногенной катастрофе. В организме наночастицы, помимо АФК, являются источником Ag(+), которые координируют молекулы цистеина, металлотионеина и глутатиона (*Pem, 2019*). Так как ионы Ag(+) изоэлектронны ионам Cu(+), эссенциальному убиквитическому микроэлементу (*Mukherjee et al., 1987; Puchkova et al., 2019; Lynch&Duckworth, 2019*), они могут быть вовлечены в метаболические процессы, контролируемые медью. Медь в качестве катализатора окислительно-восстановительных реакций (*Krupanidhi et al., 2008*) и вторичного мессенджера (*Xie&Collins, 2013; D'Ambrosi&Rossi, 2015; Kardos et al., 2018*) выполняет ряд жизненно важных физиологических функций. Эссенциальность меди сочетается с ее высокой токсичностью (*Linder, 2012*), которая преодолевается с помощью системы Cu(I)-транспортных белков, осуществляющих безопасный перенос меди из внешней среды в клетки к местам формирования купроэнзимов (*Lutsenko, 2016*). Врожденные ошибки и экологические сдвиги баланса меди ответственны за развитие медь-зависимых заболеваний, к которым относятся нейродегенеративные, онкологические, сердечно-сосудистые и другие тяжелые заболевания (*Potocki et al., 2012*). Ионы Ag(+) хелатируются Cu(I)-связывающими мотивами транспортных белков и интегрируются в метаболизм меди: включаются в купроэнзимы, содержащие в активных центрах остатки цистеина (*Puchkova et al., 2019*), связываются с металлотионеином (*Sácký et al., 2014*), замещают медь в одорантных рецепторах (*Li et al., 2016*), формируют стабильные комплексы с остатками цистеина в классических цинковых пальцах и цинковых пальцах растворимых ядерных рецепторов гормонов (*Kluska et al., 2020*), аккумулируются в ядре и митохондриях (*Pleychova et al., 2019*). В результате энзиматическая активность ряда купроэнзимов нарушается, а медь-зависимые регуляторные белки утрачивают способность к специфическим взаимодействиям, контролирующим сигналинг, транскрипцию, апоптоз, пролиферацию. Последствия могут оказаться очень значительными, так как касаются регуляции активности

нескольких сотен генов. Для развития такого сценария высокие концентрации AgNPs не требуются. Исследований, оценивающих способность низких концентраций наночастиц серебра вмешиваться в метаболизм меди, практически нет. Представленная работа фокусируется на изучении путей вмешательства серебра в метаболизм меди млекопитающих и связи между биоактивностью AgNPs, их линейным размером и формой. Изложенное выше свидетельствует об *актуальности исследования*.

Цель исследования – изучение путей вмешательства AgNPs в метаболизм меди, перемещения серебра наночастиц (наносеребра) в целом организме, а также зависимости биоактивности AgNPs от их размера и формы.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить способность AgNPs вмешиваться в метаболизм меди *in vivo*.
2. Охарактеризовать биологическую активность сферических AgNPs разного диаметра.
3. Изучить распределение серебра AgNPs в организме мышей, пути его поступления в кровотоки и экскрецию.
4. Исследовать способность AgNPs *in vitro* взаимодействовать с белками сыворотки крови, с которыми серебро AgNPs ассоциировано *in vivo*.
5. Сравнить биоактивность AgNPs одинакового линейного размера разной формы.

Научная новизна полученных результатов. В работе впервые исследовано влияние низких концентраций AgNPs на метаболизм меди млекопитающих в рамках концепции, которая рассматривает способность серебра AgNPs включаться в метаболические пути меди как основную экологическую опасность AgNPs для человека. Впервые показано, что введение лабораторным мышам AgNPs приводит к снижению двух основных показателей статуса меди в сыворотке крови: атомной концентрации меди и оксидазной активности церулоплазмينا (ЦП), основного медьсодержащего внеклеточного белка млекопитающих. Снижение оксидазной активности происходит потому, что ионы Ag(+), диссоциирующие с поверхности наночастиц, транспортируются в клетки печени, метаболически включаются в активные центры ЦП, синтезирующегося в аппарате Гольджи, формируя Ag-ЦП, который секретируется в кровотоки. Ионы Ag(+) экскретируются из организма мышей в основном через желчь. Степень снижения показателей статуса меди зависит от размера сферических наночастиц. Ag(+) наночастиц и Ag-ЦП перемещаются в организме мышей по маршрутам меди и холо-ЦП. В сыворотке крови мышей, обработанных AgNPs, серебро, помимо ЦП, обнаруживается во фракции, содержащей альфа-2-макроглобулин (α2MG), с которым, в отличие от ЦП, AgNPs связываются *in vitro*. Кроме того, впервые показано, что антибактериальная активность и способность влиять на метаболизм меди млекопитающих сферических AgNPs разного линейного размера не совпадают: чем меньше диаметр AgNPs, тем выше их биоцидная активность, и, напротив, чем меньше диаметр AgNPs, тем их способность снижать показатели статуса меди, ниже.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные расширяют представления о потенциальной опасности даже низких концентраций AgNPs, попадающих в организм млекопитающих. Это связано с тем, что абсорбированное серебро наночастиц по кровотоку доставляется в печень, в клетках которой переносится в люмен аппарата Гольджи и встраивается вместо меди в

активные центры ЦП, вызывая нарушение укладки белковой глобулы. В кровотоке секретируется Ag-ЦП, потерявший оксидазную активность, но способный доставить серебро в другие органы. В клетках ионы Ag(+) локализуются в цитозоле, аккумулируются в митохондриях и в ядрах, что обеспечивает им доступ ко всем регуляторным белкам, чья активность зависит от меди. Замещение меди серебром в этих белках может быть причиной развития её дисбаланса, что ведет к возникновению медь-зависимых заболеваний.

К значимым практическим результатам диссертации относится следующее. В работе впервые показано, что антибактериальная активность сферических AgNPs тем выше, чем меньше линейный размер частиц и, наоборот, чем больше размер AgNPs, тем влияние их на метаболизм меди мышей эффективнее. Выявленная зависимость позволяет научно-обоснованно рекомендовать AgNPs с оптимальным сочетанием свойств, влияющих на их биоактивность. Исследование показало, что AgNPs является удобным инструментом для снижения/восстановления содержания холо-ЦП в крови. Известно, что растущие опухоли разной локализации, стимулируют активность гена ЦП в печени, необходимого для роста сосудов (*Babich et al., 2013*). Ag-индуцируемое снижение уровня холо-ЦП может блокировать доступность меди для растущих твердых опухолей. К научно-практической значимости работы относится и то, что в ходе ее выполнения произведены AgNPs, биологическая активность которых охарактеризована на разных объектах *in vitro* и *in vivo*, что может служить для их сертификации при промышленном производстве.

Положения, выносимые на защиту

1. Наносеребро, продуцируемое AgNPs, поглощается клетками печени, доставляется к местам формирования купрозонимов, поступает в митохондрии, ядра и люмен аппарата Гольджи. В аппарате Гольджи Ag(+) включается в ЦП, образуя Ag-ЦП, не обладающий оксидазной активностью. Ag-ЦП секретируется в кровоток, что сопровождается падением оксидазной активности и концентрации атомной меди в сыворотке крови. Ионы серебра не влияют на экспрессию гена ЦП.
2. Абсорбированное серебро наночастиц связывается с a2MG и эндоцитируется гепатоцитами. По кровотоку серебро наночастиц переносится в печень в составе комплекса с a2MG. Выведение Ag(+) осуществляется с желчью.
3. Чем меньше линейный размер AgNPs, тем эффективнее их антибактериальные свойства и тем меньше выражена их способность влиять на статус меди в сыворотке крови млекопитающих.
4. Несферические AgNPs, по сравнению со сферическими того же линейного размера (75 нм), в 1000 раз эффективнее как антибактериальные препараты, и не отличаются по способности вмешиваться в метаболизм меди млекопитающих.

Достоверность полученных результатов обеспечивается тем, что все исследования проведены на репрезентативных группах, осуществлены современными, адекватными поставленным задачам методами, достаточным объемом фактического материала, который обработан с использованием соответствующих методов статистики, применяемых в биологических исследованиях, обсуждением результатов работы на профильных международных конференциях и публикацией результатов исследования в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах.

Апробация результатов. Основные результаты работы были доложены и обсуждены на международных конференциях: 6th International Symposium Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals (26-28 мая 2016 г, г. Катания, Италия, устное сообщение); 16th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals (ТЕМА-16) (26 – 29 июня 2017 г, г. Санкт-Петербург, Россия; два сообщения, одно из которых устный доклад); 11th International Copper Meeting (23-28 сентября 2018 г, г. Сорренто, Неаполь, Италия); 43rd FEBS Congress (7 – 12 июля 2018 г, г. Прага, Чехия); 44th FEBS Congress (6 – 11 июля 2019 г, г. Краков, Польша); 20-ой и 23-ей Международных Пуцинских школах-конференциях молодых ученых «Биология - наука XXI века» (18 – 22 апреля 2016 г. и 15 – 18 апреля 2019 г. Пушино, Московская область, Россия; устные сообщения); IV конференции молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности» (16 – 18 сентября 2020 г, пос. Рошино, Ленинградская область, устное сообщение).

Личный вклад автора в работу включает участие в разработке идей, последовательное планирование и постановку комплексных экспериментов, обработку и анализ данных, участие в написании научных статей, представление полученных результатов на российских и международных конференциях. В разных совместных публикациях вклад автора составил от 30 до 95%.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ, из которых 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, и 7 тезисов докладов, три из которых имеют DOI.

Финансовая поддержка исследования. Работа выполнена в МНЛ изучения метаболизма микроэлементов Университета ИТМО на средства программы «5 в 100». Работа поддержана грантами РФФИ № 18-515-7811 Итал_т и №16-34-60219 мол_а_дк; а также Грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-2718.2018.4.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 140 стр. и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов с обсуждением, заключения, выводов и списка сокращений. Список цитированной литературы включает 280 источников, из которых 37 отечественных (цитируются в открытой базе “PubMed”). Работа проиллюстрирована 42 рисунками и шестью таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В обзоре литературы представлены сведения о разнообразии современных наноматериалов и областях их применения. Обобщены и проанализированы молекулярные и клеточные механизмы антибактериального действия AgNPs в зависимости от их формы и размера. Рассмотрены современные представления о механизмах токсичности AgNPs для млекопитающих. Детально проанализированы их способность влиять на метаболизм меди млекопитающих и потенциальные опасности этого вмешательства.

Материалы и методы исследования

Стабильные препараты AgNPs разного размера и формы были синтезированы в Университете ИТМО. Их физико-химическая характеристика была выполнена в Центре физики наногетероструктур ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН с помощью UV/vis-спектрометрии,

рентгеновской дифракции, сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии, энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и лазерной дифрактометрии (Табл. 1).

Таблица 1. Физико-химические свойства полученных AgNPs.

ПАРАМЕТРЫ	AgNPs				
	AgNPs-1	AgNP10	AgNP20	AgNP75	nsAgNP75
UV/vis, D _{max} , нм	405	390	433	413	406
[Ag], мМ	4.6	7.1	6.9	7.4	8.1
Коэффициент молярной экстинкции, л/моль*см	-	10200	8900	9840	8260
Размер, нм	20-30	10	18-20	71-84	71 – 84
Форма	Сфер.	Сфер.	Сфер.	Сфер.	Несфер.
Доля ионного серебра	Не опр.	<1%	<1%	<1%	<1%
Восстановитель	Флавоноиды	Гидразин гидрат	Гидразин гидрат	Гидразин гидрат	Гидразин гидрат
Стабилизатор	β-циклодекстрин	Олеат калия	Олеат калия	Олеат калия	Олеат калия

При выполнении работы были использованы бактериофаг φ80 vir; клетки гаплоидного штамма дрожжей *S. cerevisiae* p192 генотипа *MATa ade2-192*; Клетки *E. coli*, штамм BL21 (DE3) с генотипом *E. coli B F-dcm ompT hsdS (rB-mB-) gal λ(DE3)*, клетки *E. coli* штамма *E. coli/NdCTR1*, продуцирующие полноразмерный внеклеточный домен hCTR1, слитый с GST; культивируемые клетки человека линий A549, HepG2, HEK293, а также клетки линии H1299 и клоны этой линии с нокаутированными генами *CTR1*, *DMT1* и двумя этими генами: *CTR1-KO*, *DMT1-KO* и *DKO*, соответственно. Для получения клонов-нокаутов клетки линии H1299 трансфицировали плазмидами CRISPR-Cas9 KO со специфическими 20-нуклеотидными направляющими РНК (gRNA) специфическими для генов *CTR1* и *DMT1*. Также в работе были использованы пресноводные моллюски *Planorbarius corneus* и 7–8-недельные мыши-самцы линии C57BL/6. Проведение экспериментов на мышах было одобрено локальным Этическим Комитетом при Институте экспериментальной медицины (номер протокола N2/13 утвержден 27 июня 2013 г; номер протокола N1/16 утвержден 24 марта 2016 г, Академика Павлова ул., 12, Санкт-Петербург, 197376 Россия). **Обработка AgNPs прокариотов, одноклеточных эукариотов, культивируемых клеток и беспозвоночных** проводилась как описано ранее (*Sankova et al., 2016*). Влияние AgNPs на клетки *E. coli*, *S. cerevisiae*, φ80 vir оценивали по колониеобразующей активности (lgКОЕ). Метаболическую активность культивируемых клеток определяли с помощью МТТ-теста. **Введение мышам наночастиц серебра** осуществляли интраперитонеально или перорально через зонд, количество введений указано в подписях к рисункам. Между последним введением и забором образцов проходило не менее трех часов. Для забора крови животных слегка наркотизировали диэтиловым эфиром, эвтаназию проводили дислокацией шейных позвонков. Образцы крови собирали из глазного синуса. После формирования сгустка сыворотку отделяли центрифугированием со скоростью 1000×g в течение 10 минут при 4 °С. Образцы желчи и мочи собирали шприцем соответственно из желчного или мочевого пузыря, центрифугировали 15 мин при 10000×g, собирали супернатанты. Биологические образцы хранили при температуре –80 °С и размораживали один раз непосредственно перед использованием. **Определение оксидазной активности ЦП в сыворотке крови** проводили с помощью окрашивания раствором орто-дианизидина 8% ПААГ после фракционирования в нем 1 мкл сыворотки в неденатурирующих условиях. **Измерение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспаратаминотрансферазы (АСТ)** осуществляли с помощью колориметрического метода Райтмана-Френкеля в соответствии с инструкциями к наборам АЛТ-РФ и АСТ-РФ (Ольвекс-Диагностикум, СПб, Россия). Оптическую плотность образцов измеряли при 537 нм. **Выявление ферментативной активности СОД1** проводили

в цитозоле печени мышей. Для этого 8% ПААГ после нативного электрофореза инкубировали в 0,1% растворе Nitroblue tetrazolium, приготовленном на 100 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7.0. Затем гель промывали в воде, инкубировали в темноте в 100 мМ калий-фосфатном буфере с добавлением 0,001% TEMED и 0,1% рибофлавина и повторно промывали в воде. Просмотр геля осуществляли с помощью УФ-трансиллюминатора до появления обесцвеченных полос. **Измерение фенолоксидазной активности гемолимфы моллюсков** осуществляли с помощью колориметрического метода с L-DOPA в качестве субстрата (Laughton&Siva-Jothy, 2014) в 96-луночных планшетах. **Относительное содержание зрелой ЦП-мРНК** в печени определяли с помощью ОТ-ПЦР (Orlov et al., 2016). В качестве гена сравнения использовали β -актин. Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов проводили в 1.4% агарозном геле на TBE буфере с добавлением бромистого этидия. В качестве маркера использовали набор из 10 фрагментов ДНК длиной от 100 до 1000 п.н. (Медиген, Россия). **Для количественной оценки уровня экспрессии генов CTR1 и DMT1** применяли метод ОТ-ПЦР в реальном времени (qRT-PCR с использованием Sybr Green PCR master mix (Applied Biosystem, США). Образцы были нормализованы на экспрессию гена β -актина, их уровень в КО клонах сравнивали с родительскими клетками. **Определение относительного содержания белка ЦП** в образцах сывороток крови, желчи, хроматографических фракций, а также субклеточных фракций печени, содержащих аппарат Гольджи, проводили методом иммуноблоттинга после разделения в 8% SDS-ПААГ (Zatulovskaia et al., 2015). В качестве первых антител использовали некоммерческие кроличьи антитела к высокоочищенному препарату ЦП мыши ($A_{610/280} = 0.0469$), выделенному через взаимодействие с неомицином (Sokolov et al., 2012). В качестве вторых антител использовали IgG козла, иммунизированного IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания). Комплексы антител выявляли в системе ECL (Amersham, GE Healthcare, США). **Гель-фильтрацию** образцов сыворотки крови (2 мл) осуществляли на колонке Sephadex G75 Superfine column (10-40 мкм; 1.6×40 см) в PBS, рН 7.4. Свободный объем колонки определяли, используя декстран синий. Последующие фракции, объемом ~1.5 мл, собирали и определяли их оптическую плотность при A_{280} . По скорости элюции ЦП, бычьего сывороточного альбумина (BCA или BSA) и металлотионеина на гель-хроматограмме оценивали молекулярную массу элюируемых белков. Для **in vitro обработки белков препаратами AgNPs** аликвоты ЦП крысы ($A_{610/280}=0.0498$), BSA и хроматографических фракций #4 и #5 сыворотки крови интактных мышей, **in vivo** связывающие серебро, инкубировали с 50 мкМ AgNP75 в течение 72 ч при температуре +10 °С и записывали UV/vis спектры до инкубации, во время инкубации и после осаждения AgNPs центрифугированием при 30000×g в течение 3 часов. **Выявление серебра, ассоциированного с ЦП, в желчи** осуществляли с помощью иммунопреципитации по следующей схеме. К 20 мкл желчи добавляли 50 мкг антител к ЦП мыши в 50 мкл PBS. Смесь инкубировали в течение ночи при +4 °С, затем добавляли 100 мкг (5 мг/мл) козлиных антител к IgG кролика и инкубировали в течение 4 часов при комнатной температуре. Инкубационную смесь центрифугировали 15 мин при 10000×g, супернатант собирали, осадок дважды промывали PBS и растворяли в высокочистой азотной кислоте. В супернатанте и растворенном осадке измеряли концентрацию металлов. **Детекцию de novo синтезированного ^{14}C ЦП в желчи** осуществляли в эксперименте пульс-чейз типа. Мыши весом около 20 г были наркотизированы, затем левую сонную артерию катетеризировали с использованием катетера с пробкой на дистальном конце, через который вводили 0.1 мКи [^{14}C]Leu (Изотоп, Чехословакия), через 20 мин вводили 100-кратный избыток немеченого L-лейцина (Sigma, США). Образцы крови собирали через 30, 60 и 90 мин, в эти же временные интервалы желчь собирали шприцем (B. Brawn, Germany). Аликвоты образцов желчи доводили до 50 мкл и преципитировали ЦП, как описано выше. Осадок растворяли в 0.1% SDS, 1/3 объема наносили на фильтры Ватманн 3 (Hahnemühle, Дассель, Германия), высушивали и определяли в них радиоактивность, ассоциированную с ЦП. Общую радиоактивность определяли в аликвотах желчи, абсорбированных на фильтрах, которые после высыхания образцов кипятили 10 мин в 10% ТХУ. Специфическую радиоактивность

ЦП рассчитывали, как процент радиоактивности в преципитате к общей радиоактивности. **Получение субклеточных фракций** проводили методом дифференциального центрифугирования в буфере, содержащем 0.25 М сахарозу, 20 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 2 мМ DTT, ингибиторы протеаз. **Общие методы.** Концентрацию металлов измеряли с помощью атомно-абсорбционного спектрометра с зеемановской коррекцией ZEE nit 650P (Analytik Jena, Германия). Образцы растворяли в концентрированной высокочистой азотной кислоте. Концентрацию белка определяли методом Бредфорда. В качестве белковых маркеров использовали смесь окрашенных белков Thermo Scientific (США). ПЦР-праймеры подобраны по программе “Primer-BLAST” (version 4.1.0, NCBI, США). Денситометрический анализ электрофоретических гелей проводили с помощью программы ImageJ. Полученные данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (M±SD). Значимость изменений определяли с помощью непарного двустороннего t-критерия Стьюдента; изменения считались значимыми при *: $p < 0.05$. (Statistica 8.0, StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Антибактериальная и цитотоксическая активность AgNPs

AgNPs были стандартно тестированы на биоцидную и цитотоксическую активности. Основные результаты, полученные при испытании их антибактериальной активности суммированы в Таблице 2. Видно, что обработка клеток штамма K802 наночастицами в течение трех часов подавляет их рост в зависимости от размера и формы частиц. Так, за одно и то же время и при одинаковой концентрации AgNP10 снижают рост бактерий на 3 порядка, а AgNP75 только на 1.5 порядка. Однако несферические 75-нм частицы – почти на 2 порядка. При увеличении концентрации AgNPs до 200 мкМ 10-нм и несферические 75-нм частицы уже через 30 мин почти полностью подавляли рост бактерий, а сферические 75-нм снижали КОЕ только на 2 порядка по сравнению с контролем. AgNPs-1 достоверно, но лишь в 1.5 раза снижали рост дрожжей *S. cerevisiae* и вирулентность бактериофага φ80.

Штамм *E. coli*, экспрессирующий внеклеточный домен универсального транспортера меди человека CTR1 (NdCTR1), связывающий ионы серебра, был на 3 порядка устойчивее к обработке AgNP-1, по сравнению со штаммом, трансформированным пустой плазмидой. Это убедительно свидетельствует, что образующиеся в ходе химической модификации Ag(+), являются основным антибактериальным фактором наночастиц серебра.

Таблица 2. Сравнительная антибактериальная активность приготовленных AgNPs.

Препараты наночастиц серебра	<i>E. coli</i> K802			<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pGEX4T-1		<i>E. coli</i> BL21(DE3)/NdCTR1	
	Выживаемость клеток, колониеобразующие единицы (lgКОЕ)						
	Контроль	20 мкМ AgNPs, 3 ч	200 мкМ, AgNPs, 0.5 ч	Контроль	10 мкМ AgNPs, 24 ч	Контроль	10 мкМ AgNPs, 24 ч
AgNP10	10 ⁸	5x10 ⁴	1x10 ²	-	-	-	-
AgNP20	10 ⁸	5x10 ⁵	1x10 ⁴	-	-	-	-
AgNP75	10 ⁸	5x10 ⁶	1x10 ⁶	-	-	-	-
nsAgNP75	10 ⁸	10 ⁵	1x10 ²	-	-	-	-
AgNP-1	-	-	-	10 ⁷	<10 ²	10 ⁷	5x10 ⁵

Цитотоксичность AgNPs была испытана на культивируемых клетках человека линий HepG2, первично полученных из гепатобластомы, HEK293 выделенных из эмбриональной почки человека, и A549, происходящих из аденокарциномы легочного эпителия (стандартно используемые в качестве модели для испытания токсичности). Результаты, приведенные на рисунке 1, показывают, что клетки HepG2 чувствительнее к AgNPs-1 (LD₅₀ составляет около 200 мкМ), чем клетки HEK293 (LD₅₀ 300 мкМ). Концентрация AgNPs-1, при которой выживают 10% клеток, составляет для HepG2 примерно 600 мкМ, для HEK293 – 800 мкМ. Эти данные показывают, что (1) клетки высших млекопитающих более устойчивы к обработке AgNPs-1, чем бактерии (см. Табл. 2), и (2) клетки HepG2 чувствительнее к обработке AgNPs-1, чем клетки HEK293. Последнее можно объяснить тем, что клетки HepG2, как клетки печеночного происхождения, имеют механизмы поглощения Cu(I)/Ag(I) из окружающей среды и эффективнее аккумулируют Ag. Это согласуется с данными, показывающими, что *in vivo* печень интенсивнее накапливает серебро наночастиц, чем почки (Fondevila et al., 2009). В клетках HepG2 серебро не распределяется диффузно, оно накапливается в ядре и митохондриях. Способность митохондрий поглощать избыток Cu(+)/Ag(+) из цитозоля описана для дрожжей, а также митохондрий мышей и крыс (Cobine et al., 2004; Cobine et al., 2006; Klotchenko et al., 2008; Zatulovskiy et al., 2012).

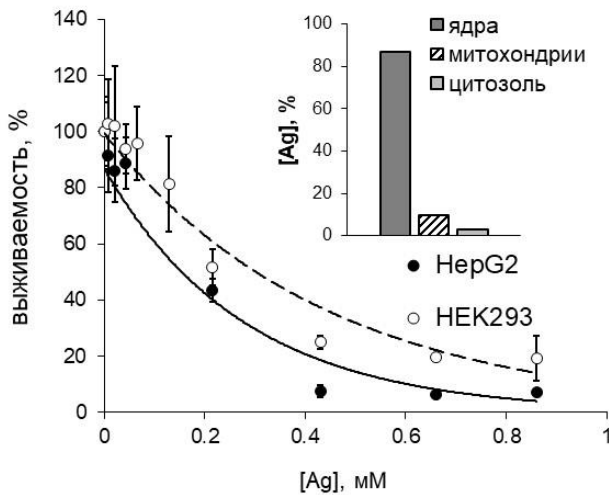


Рисунок 1. Метаболическая активность культивируемых клеток, обработанных AgNPs-1. Врезка: внутриклеточное распределение серебра в клетках линии HepG2.

Клетки A549 отвечают на обработку наночастицами разного диаметра в дозо- и время- зависимой манере, однако, прямая корреляция между диаметром частиц и их цитотоксичностью отсутствует (Рис. 2). nsAgNP75 демонстрируют более высокую цитотоксичность, зависящую от дозы и времени воздействия, по сравнению со сферическими AgNP75 (Рис. 3).

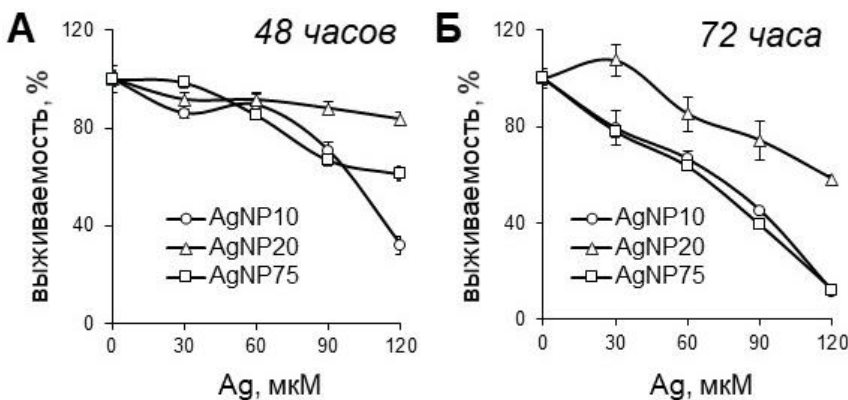


Рисунок 2. Дозо- и время-зависимый цитотоксический эффект AgNPs на рост клеток линии A549 в течение 48 (А) и 72 (Б) часов.

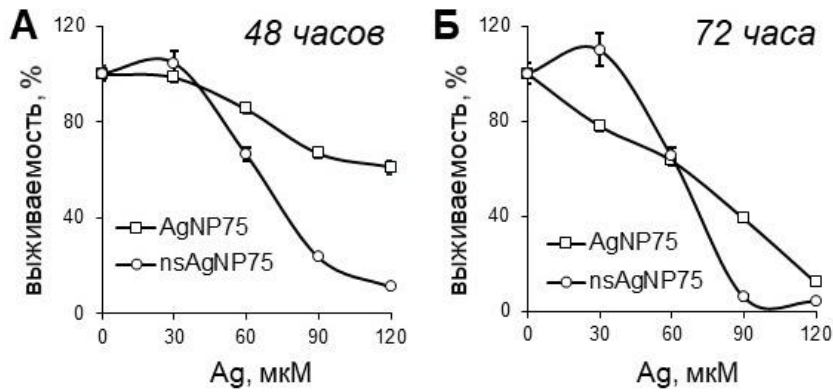


Рисунок 3.

Выживаемость клеток A549 при инкубации с разными концентрациями AgNP75 и nsAgNP75 в течение 48 (А) и 72 (Б) часов.

Роль транспортеров меди *CTR1* и *DMT1* во внутриклеточном распределении серебра была изучена на клетках линии H1299 (производных линии A549) с нокаутом генов *CTR1* (*CTR1-KO*), *DMT1* (*DMT1-KO*) или их двойным нокаутом (*DKO*), полученных с помощью технологии CRISPR/Cas9. Скорость роста клеток с утраченными генами соответствовал таковому у штамма дикого типа. Эффективность нокаута была подтверждена отсутствием *CTR1*-мРНК и *DMT1*-мРНК в клетках с соответствующим нокаутом (Рис. 4). Видно, что в клетках *CTR1-KO* и *DMT1-KO* нет мРНК, кодирующих соответствующие белки. При этом в клетках с одним нокаутированным геном наблюдается компенсирующая активность другого гена. В клетках с двойным нокаутом ни один из генов, участвующих в транспорте $\text{Cu}(+)/\text{Ag}(+)$, не экспрессируется (Ilyechova et al., 2019). Таким образом, полученные клетки могут быть использованы для изучения роли импортеров меди в распределении серебра в клетках.

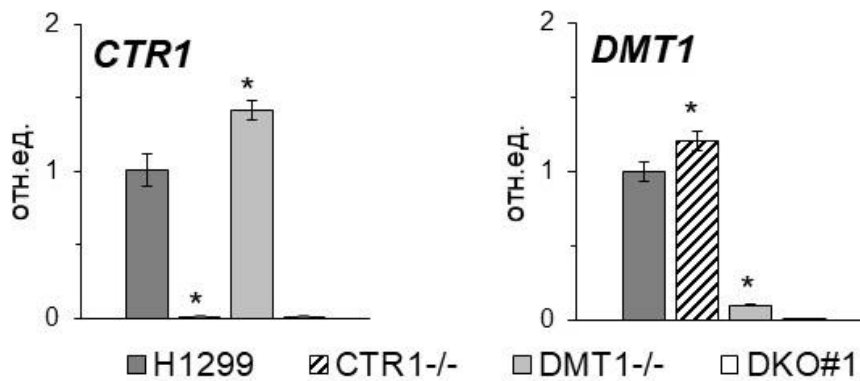


Рисунок 4. Изменение экспрессии генов *CTR1* и *DMT1* в клетках H1299 с нокаутом этих генов. Ось ординат: содержание зрелых транскриптов (мРНК *CTR1* или *DMT1*/мРНК β -актина).

Клетки клонов *CTR1-KO* и *DKO*, в отличие от клеток, потерявших только ген *DMT1*, продемонстрировали устойчивость к действию серебра (Рис. 5). Распределение серебра в клеточных органеллах в нокаутных клетках показало, что серебро импортируется в клетки обоими транспортерами (Рис. 6). Основная доля серебра, импортированного в клетки, локализуется в митохондриях. Серебро, импортируемое через *CTR1*, доставляется преимущественно в митохондрии и аппарат Гольджи. Через *DMT1* серебро преимущественно поступает в ядра. Данные также показывают, что в *DKO* клетках поступление серебра блокировано не полностью. Это указывает на возможное существование альтернативного пути поглощения серебра.

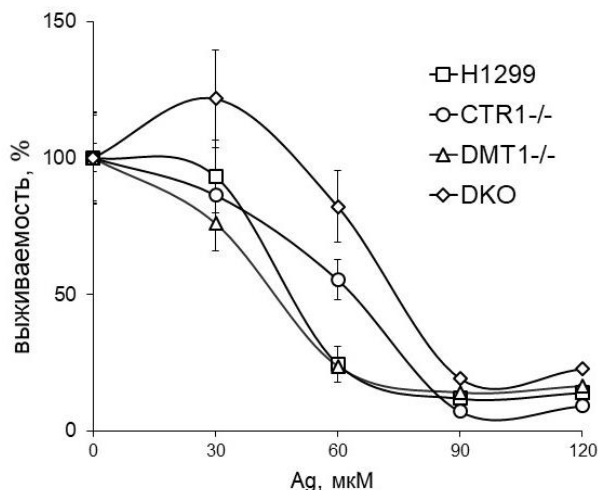


Рисунок 5. Выживаемость клеток H1299, CTR1-KO, DMT1-KO и DKO при обработке серебром.

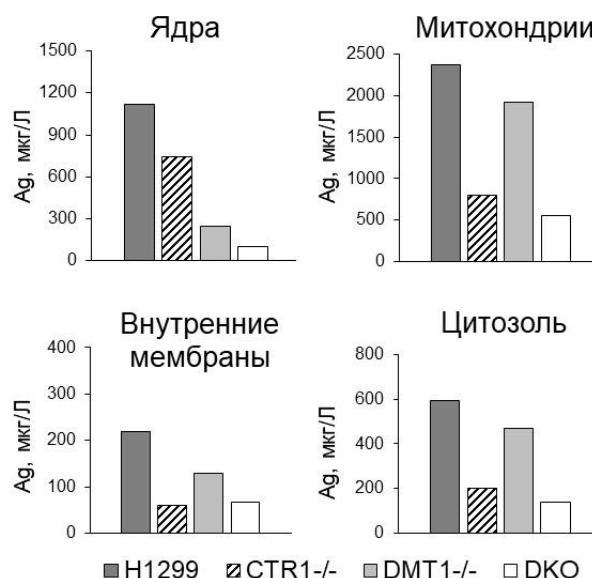


Рисунок 6. Распределение серебра в субклеточных фракциях клеток H1299, CTR1-KO, DMT1-KO и DKO. Представлены средние значения из трех независимых опытов.

2. Способность AgNPs вмешиваться в метаболизм меди *in vivo*.

Для оценки влияния AgNPs на метаболизм меди мышей на основе данных литературы была выбрана концентрация AgNPs, которая не вызывала признаков токсичности. В *in vivo* экспериментах на млекопитающих показано, что введение AgNPs в концентрации от ~2.25 – 14 мг/кг массы тела ежедневно в течение 9 дней вызывает слабый токсический эффект; от 50.0 – 500 мг/кг массы тела ежедневно в течение недели или при пероральных нагрузках приводит к токсическому эффекту (Hadrup et al., 2011; Sharma et al., 2015; Sharma et al., 2019; Loeschner et al., 2011; Katsnelson et al., 2015; Kim et al., 2010). Очевидно, что с концентрацией AgNPs даже ~10 мг/кг массы тела, человек может контактировать только в чрезвычайных ситуациях. Задача состояла в сведении к минимуму токсического эффекта AgNPs, поэтому мышам вводили 0.4 мг серебра наночастиц на 1 кг массы тела в течение 7 дней (кумулятивный эффект составлял примерно ~3 мг на 1 кг массы тела). У мышей не наблюдали потерю или прибавку веса, изменение аппетита, поведения, повышения в крови концентрации ферментов АЛТ и АСТ, маркеров нарушения работы печени.

В организме мышей, обработанных AgNPs, серебро распределяется неравномерно. Максимальная концентрация наносеребра обнаруживается в печени и снижается в ряду печень → селезенка → легкие → почки → сердце → мозг (Рис. 7А). Ни распределение в организме, ни удельное содержание наносеребра не зависят от размера AgNPs.

Распределение меди и её концентрация в органах мышей, обработанных AgNPs, не изменяются (Рис. 7Б). Ag-аккумулирующая способность органов и удельное содержание в них меди не совпадают. Так, сердце и мозг, вместе с печенью, являются лидерами по содержанию меди, однако, первые практически не накапливают серебро, а селезенка, орган, в котором удельное содержание меди является относительно низким, эффективно аккумулирует серебро. Это наблюдение подчеркивает, что,

вероятно, концентрация меди в органах зависит от содержания в них купроэнзимов (лидеры: мозг, сердце и печень), а аккумуляция наносеребра зависит от других, пока не установленных, причин. Распределение и содержание наносеребра, а также концентрация меди в органах мышей после обработки psAgNP75 не отличались от таковых у мышей, обработанных сферическими частицами.

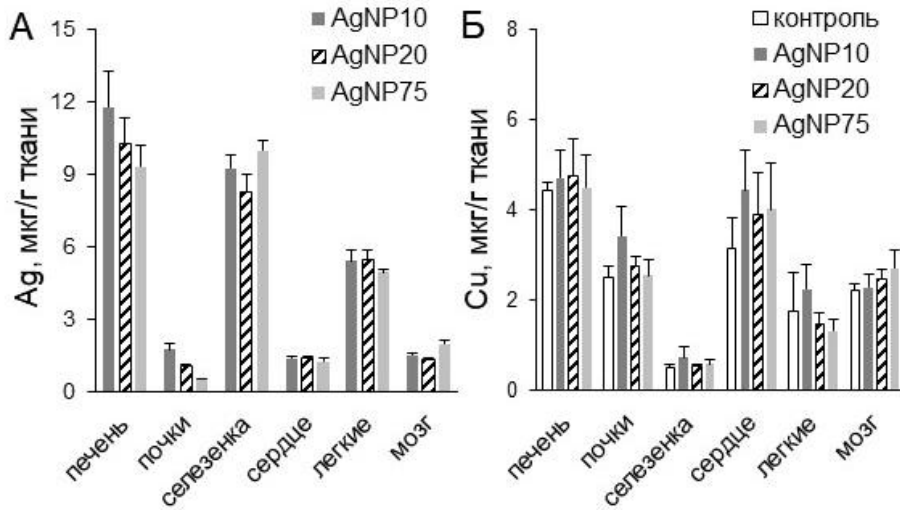


Рисунок 7. Распределение серебра (А) и меди (Б) в органах Ag-мышей после внутрибрюшинного введения AgNPs в течение 7 дней.

Для изучения влияния диаметра AgNPs на статус меди в сыворотке крови мышей и испытания каждого препарата AgNPs была создана группа животных ($n = 35$), из которой в течение семи дней инъекций через день, три, пять и семь дней отбирали по 5 животных, у которых забирали образцы для исследований. После отмены инъекций образцы были взяты через 7 и 30 дней. В образцах сывороток крови были измерены концентрация серебра, меди, оксидантная активность и уровень иммунореактивного ЦП. Результаты, представленные на рисунке 8, показывают, что через сутки после первой инъекции у мышей, обработанных AgNPs, в сыворотке крови обнаруживается серебро (Рис. 8А). Концентрация серебра в крови на протяжении всех дней обработки животных AgNPs изменяется мало. Возможно, наблюдаемое постоянство уровня содержания серебра является результирующей процесса «поступление/выведение». Через неделю после отмены инъекций концентрация серебра в сыворотке крови достоверно снижается. Остатки серебра выявляются у мышей всех групп и через 30 дней после отмены инъекций (Рис. 9А).

Концентрация меди в сыворотке мышей, получавших AgNPs, снижалась в 2 – 3 раза к седьмому дню инъекций (Рис. 8Б). После отмены введения наночастиц, концентрация сывороточной меди восстанавливается полностью через неделю (Рис. 8Б). В сыворотке крови мышей всех групп динамика снижения оксидантной активности ЦП примерно совпадает с динамикой снижения концентрации меди (Рис. 8В). За одинаковое время и при одинаковой концентрации AgNP75 вызывали полное подавление оксидантной активности, в то время как 10-нм и 20-нм AgNPs вызывали снижение оксидантной активности примерно на 70%. При этом содержание белка ЦП, по данным иммуноблотинга, не меняется (Рис. 8Г). Действие nsAgNP75 по влиянию на статус меди не отличалось от AgNP75.

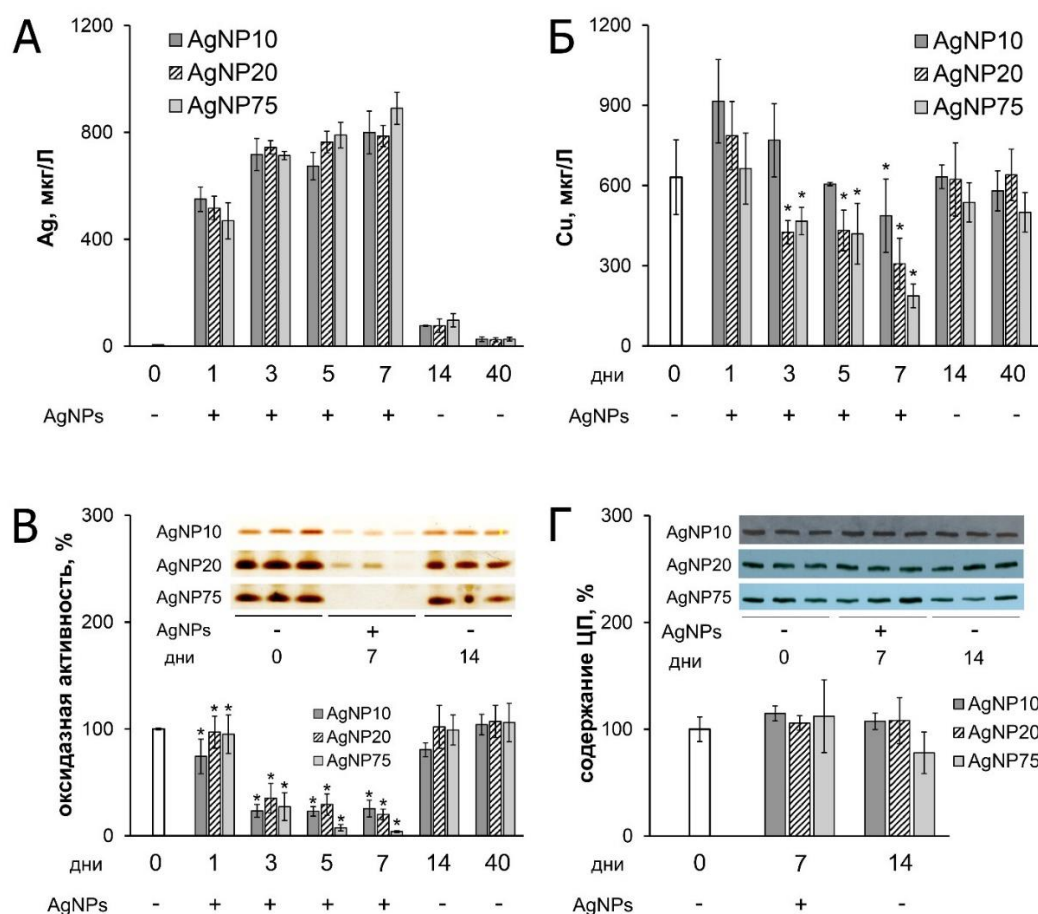


Рисунок 8. Влияние AgNPs на показатели статуса меди. Концентрация серебра (А) и меди (Б) в сыворотке крови мышей, обработанных AgNPs. (В) Оксидазная активность ЦП. Врезка: гель окрашен *o*-дианизидином. (Г) Содержание белка ЦП (%) в сыворотке крови мышей. Врезка: иммуноблоттинг образцов, оксидазная активность которых представлена на врезке рисунка 8В.

3. Наносеребро вмешивается в формирование ЦП на стадии фолдинга.

Снижение оксидазной активности в сыворотке крови мышей может происходить по нескольким причинам: (1) падает содержание ЦП-мРНК вследствие подавления транскрипционной активности гена ЦП, как результат снижается скорость трансляции ЦП; (2) блокируется секреция ЦП; (3) синтезируемый ЦП не обладает оксидазной активностью; (4) ЦП быстро деградирует в кровотоке.

Полученные данные показывают, что ни синтез ЦП-мРНК (Рис. 9), ни уровень белка ЦП в аппарате Гольджи у Ag-обработанных мышей, по сравнению с контрольными, не изменяются (Рис. 10). Постоянный уровень иммунореактивного ЦП в крови свидетельствует о том, что неоксидазный ЦП не очищается из кровотока с повышенной скоростью. Это означает, что остатки галактозы в его углеводных цепях защищены, и он не подвергается протеолизу или захвату гепатоцитарным рецептором кислых гликопротеинов (*Gregoriadis et al., 1970; Morell et al., 1971*). Приведенные данные показывают, что при обработке AgNPs, наносеребро переносится по системе $CTR1 \rightarrow ATOX1 \rightarrow ATR7B \rightarrow$ созревающий в люмене аппарата Гольджи ЦП и встраивается в его активные центры.

В то же время у Ag-мышей не меняется активность мажорного медь-зависимого фермента цитозоля Cu^{2+}/Zn^{2+} -СОД1 (Рис. 11). Это связано с тем, что в активном центре СОД1 нет лигандов для координирования Ag(I) (*Zatulovsky et al., 2012;*

Ilyechova et al., 2014; Puchkova et al., 2019. С другой стороны, они косвенно указывают на то, что, в условиях описываемого эксперимента, AgNPs не индуцируют повышения уровня АФК, достаточного для активации антиоксидантной системы. В то же время AgNPs снижают фенолоксидазную активность гемолимфы моллюска *Planorbarius corneus*, активные центры которой предположительно сходны с активными центрами ЦП (Рис. 12).

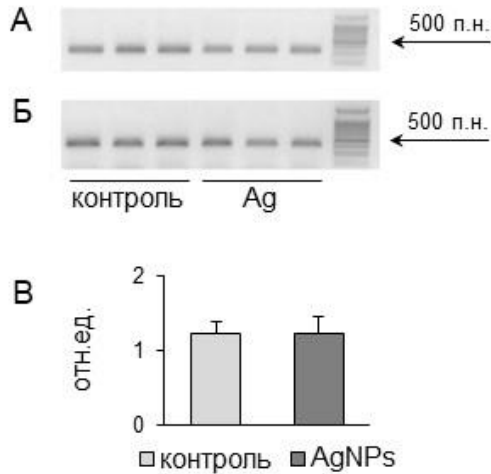


Рисунок 9. Уровень экспрессии гена ЦП в печени мышей после введения AgNPs. (А, Б) протокол электрофореза ПЦР-продуктов, (А) β -актин, (Б) ЦП; (В) Денситометрический анализ данных ОТ-ПЦР.

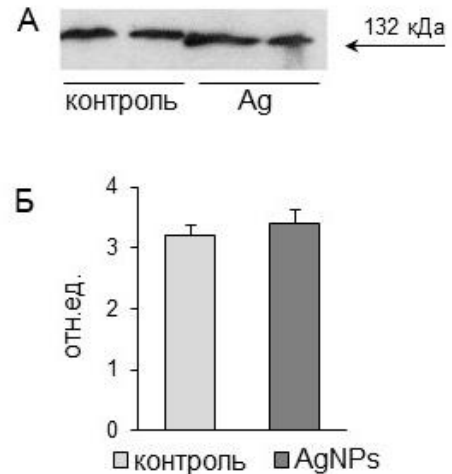


Рисунок 10. (А) Содержание ЦП в аппарате Гольджи. (Б) Денситометрический анализ данных иммуноблотинга.

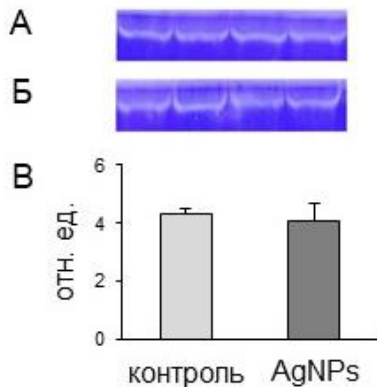


Рисунок 11. Уровень активности СОД1 в цитозоле печени контрольных мышей (А) и мышей, получавших AgNPs (Б). (В) Денситометрический анализ данных активности СОД1.

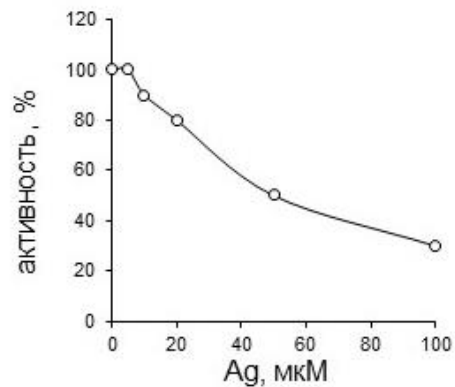


Рисунок 12. Влияние AgNPs-1 на тирозиназную активность гемолимфы моллюсков, культивируемых с разными концентрациями наночастиц. Ось ординат: % активности фенолоксидазы по отношению к контролю.

4. В сыворотке крови наносеребро связано с белками

Для анализа распределения меди и серебра, ассоциированных с белками сыворотки крови, сыворотку фракционировали методом гель-фильтрации с последующим измерением во фракциях концентрации металлов, оксидазной активности и содержания иммунореактивного ЦП. Полученные результаты представлены на рисунке 13. У интактных мышей медь на хроматограмме

распределяется в виде одного равноплечного пика (Рис. 13А). Во фракциях этого пика локализуется оксидазная активность и выявляется иммунореактивный ЦП (Рис. 13А, врезка). Минорное плечо, содержащее медь, выявляется справа от пика во фракции 16. В этой фракции иммунореактивный ЦП не выявляется. Можно предположить, что это плечо соответствует сывороточному альбумину, с которым может быть связано 5 – 10% абсорбированной $Cu(2+)$. У мышей, получавших AgNP75, ЦП, по данным иммуноблотинга, элюируется похожим пиком, содержащим медь и серебро (Рис. 13Б). При этом серебро также выявляется и в составе фракций #4, #5 и #6, в которых элюируются белковые комплексы с молекулярной массой больше 200 кДа. Данные фракции не содержат даже следов иммунореактивного ЦП. Основная масса серебра присутствует во фракции #5. В сыворотке мышей, обработанных AgNP10, AgNP20 и nsAgNP75, распределение ЦП, меди и серебра совпадают с результатами, представленными для AgNP75.

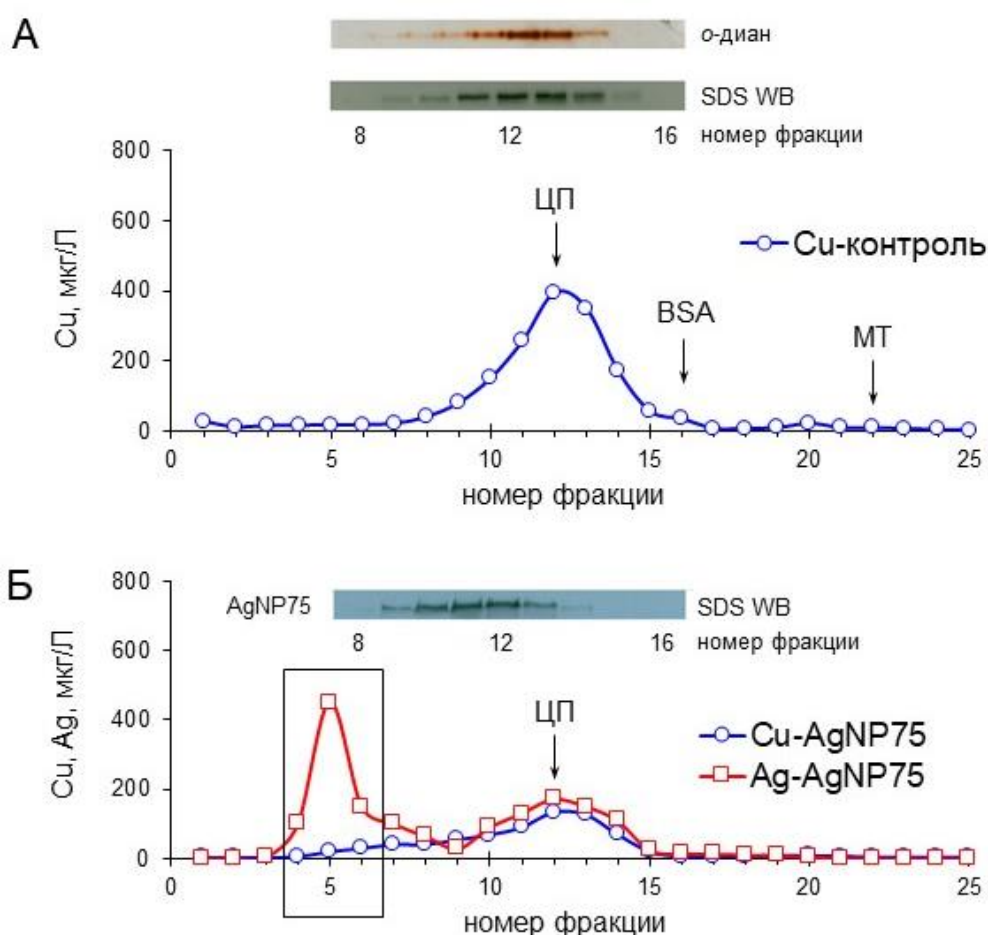


Рисунок 13. Хроматографический профиль распределения меди и серебра в сыворотке крови контрольных мышей (А) и мышей, обработанных AgNP75 (Б). Вставки: оксидазная активность и содержание ЦП в хроматографических фракциях.

Суммируя данные, полученные при сравнительном изучении биоактивности nsAgNP75, можно прийти к заключению, что несферические частицы обладают более выраженными антибактериальными и цитотоксическими свойствами по сравнению со сферическими частицами такого же линейного размера. По способности вмешиваться в метаболизм меди мышей *in vivo* несферические частицы не отличаются от сферических.

5. Изучение круговорота наносеребра в организме мышей

В этой части работы, основываясь на данных о белках, связывающих наносеребро (Рис. 13), мы попытались выявить переносчика(ов) серебра по кровотоку. Для этого была проверена способность AgNPs взаимодействовать с теми белками сыворотки крови мышей, с которыми после *in vivo* обработки ассоциируется серебро. В опытах был использован электрофоретически чистый препарат ЦП крысы ($A_{280/610} = 0.049$) как купроэнзим, для которого доказано, что в его активные центры атомы серебра встраиваются метаболически (Peychova et al., 2014). В качестве контроля использовали препарат BSA (Sigma-Aldrich, США), который является белком, не относящимся к металлопротеидам, но имеющий консервативные домены, снабженные наборами донорных групп, подходящих для координирования физиологической меди (II), цинка, никеля, кобальта и токсичного кадмия (Shenberger et al., 2015; Bossak et al., 2018). Связывать ионы Cu(II), абсорбированные в ЖКТ, и транспортировать их по кровотоку к печени является физиологической функцией альбумина (Gonzalez, 2018). При этом альбумин не связывает ионы серебра наночастиц *in vivo*, как свидетельствуют данные, представленные на рисунке 13. На способность связывать AgNPs *in vitro* также были испытаны хроматографические фракции сыворотки контрольных мышей, соответствующие фракциям #4 – #6 (Рис. 13Б, прямоугольником выделены фракции, содержащие белок(и), *in vivo* связывающие серебро).

Испытание проводили по следующей схеме: (1) записывали исходный UV/vis спектр наночастиц и белка в буфере, по составу соответствующему буферу сыворотки крови; (2) добавляли к раствору белка наночастицы, инкубировали в течение разных интервалов времени, записывая спектр; (3) центрифугировали смесь в течение 3 часов при $30000 \times g$ и записывали спектр супернатанта (см. Материалы и методы). Предполагалось, что взаимодействие между наночастицами и белками может приводить к изменению спектра, как белка, так и AgNPs. Отсутствие изменений интерпретируется как отсутствие взаимодействия между Ag(+)/AgNPs и белком. Для всех препаратов AgNPs были получены одинаковые результаты, здесь приведены данные для AgNP75, как наиболее активно влияющих на метаболизм меди млекопитающих.

Данные, полученные в этой серии экспериментов, представлены на рисунке 14. UV/vis спектры AgNP75, ЦП и BSA приведены на Рис. 14А и Б. Каждый препарат легко идентифицируется по максимуму поглощения. Чистый препарат AgNPs75 имеет максимум поглощения 413 нм (Табл. 1). Препарат BSA и фракции #4 и #5, максимально поглощают в области 280 нм. Препарат ЦП поглощает в области 280 и 610 нм. На рисунках 14А и Б приведены данные, полученные для самой длительной, 72-часовой, инкубации. Они показывают, что UV/vis спектры AgNP75, ЦП и BSA, по сравнению с нулевой точкой, не меняются. После инкубации смеси и последующего центрифугирования содержание белков ЦП и BSA в надосадочной жидкости не снижается, их подвижность в ПААГ не меняется. Как показывают результаты электрофореза образцов в ПААГ в денатурирующих восстанавливающих условиях, молекулы ЦП и BSA не фрагментируются (Рис. 14Д). Данные электрофореза в неденатурирующих условиях показывают, что ЦП не теряет оксидазную активность, соотношение апо- и холо-форм не меняется (Рис. 14Е). Это указывает на неспособность ионов серебра замещать атомы меди в холо-ЦП *in vitro*.

Спектры белков фракций #4 (Рис. 14В) и фракции #5 (Рис. 14Г), а также спектр наночастиц изменяются уже при инкубации меньше минуты. После 72-часовой

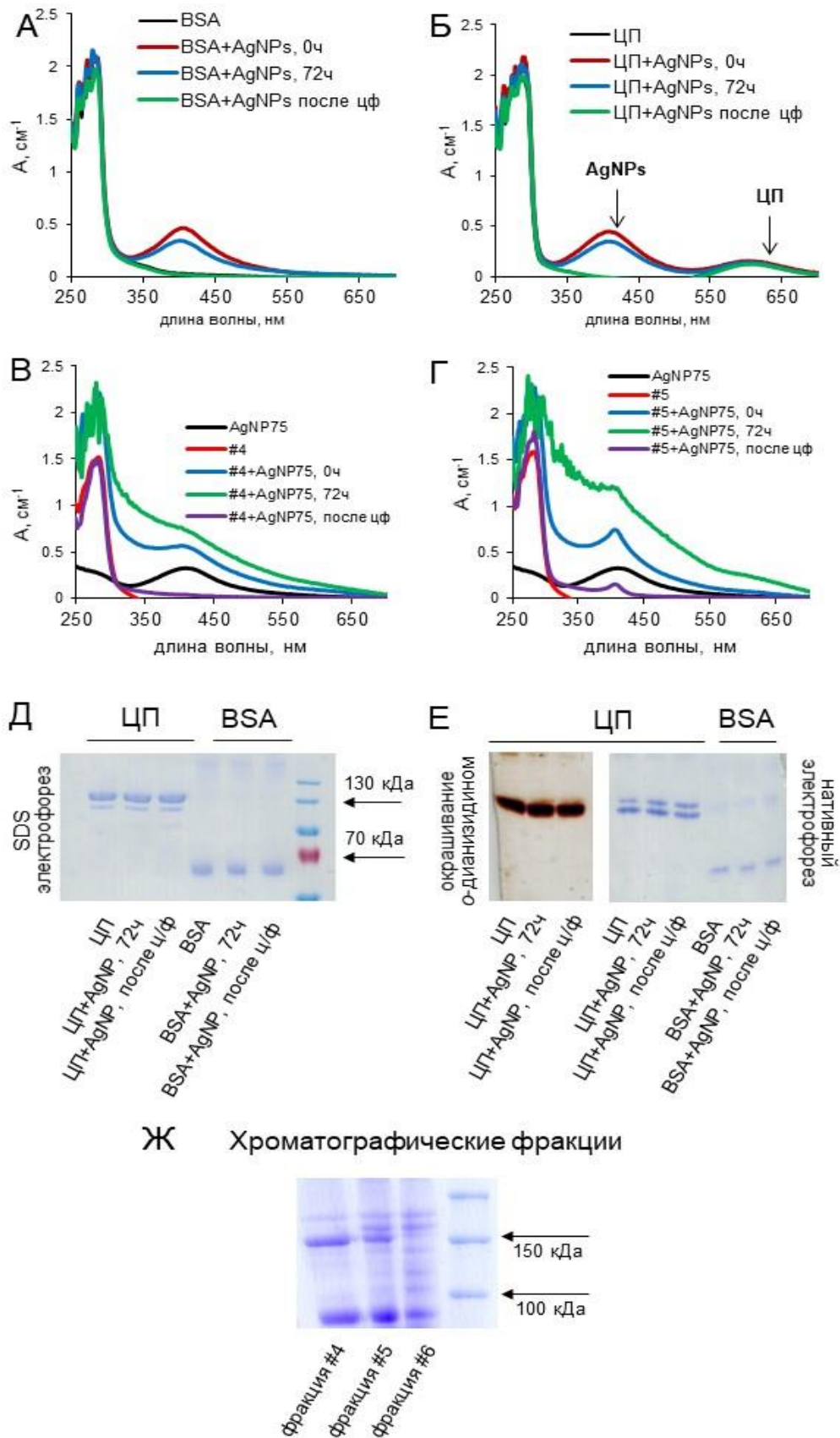


Рисунок 14. *In vitro* взаимодействие BSA (А) и ЦП (Б) с AgNPs. Изменение UV/vis спектра фракций #4 (В) и #5 (Г) после инкубации с AgNPs. (Д) Денатурирующий электрофорез в ПААГ BSA и ЦП окрашено на общий белок. (Е) Нативный электрофорез BSA и ЦП в ПААГ окрашено *o*-дианизидином или на общий белок. (Ж) Денатурирующий электрофорез хроматографических фракций сыворотки крови контрольных мышей в ПААГ.

инкубации AgNPs с фракциями сыворотки изменения спектров нарастают: максимум поглощения в области 413 нм исчезает, наночастицы не выявляются в виде дискретного пика. Центрифугирование смеси #4/AgNPs приводит к полному исчезновению поглощения, соответствующему AgNPs. В смеси #5/AgNPs материал, соответствующий наночастицам, частично остается в надосадочной жидкости (Рис. 14Г). Во фракции #6 инкубация с наночастицами не вызывала изменений спектра (данные не приводятся). Электрофоретический анализ в денатурирующих условиях выявил, что в составе белков фракций #4 и #5 присутствует мажорный полипептид (Рис. 14Ж), по молекулярной массе соответствующий субъединице альфа-2-макроглобулина ($\alpha 2\text{MG}$), белка, с которым у мышей связывается [^{110}Ag], введенный в кровотоки (Hanson et al., 2001). Во фракции #6 полипептид с соответствующей молекулярной массой отсутствует. Приведенные данные показывают, что признаки взаимодействия наночастиц и белков обнаруживаются только во фракциях, содержащих субъединицу $\alpha 2\text{MG}$. При этом уровень взаимодействия коррелирует с содержанием $\alpha 2\text{MG}$, о чем можно обоснованно судить по данным денатурирующего электрофореза: фракция #4 содержит $\alpha 2\text{MG}$ как мажорный белок, в то время как во фракции #5 он не является преимущественным, а во фракции #6 отсутствует (Рис. 14Ж). Таким образом, данные показывают, что $\alpha 2\text{MG}$ связывает и переносит наносеребро по кровотоку (Рис. 15).

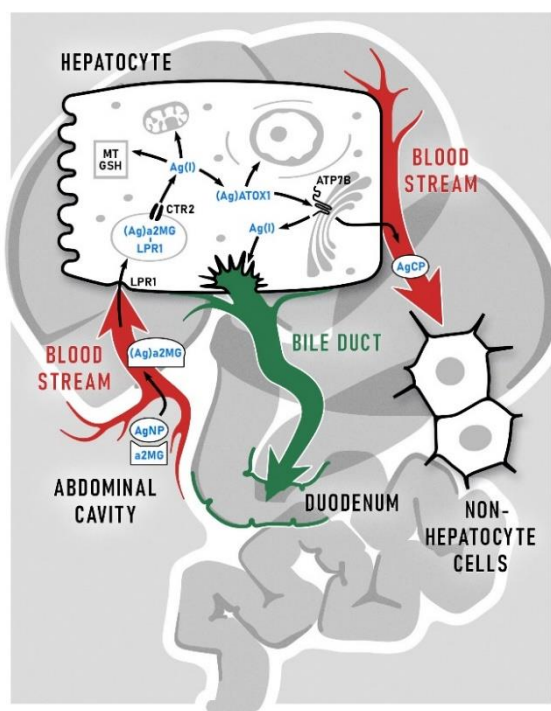


Рисунок 15. Схема, обобщающая предполагаемые маршруты $\text{Ag}(+)$ в организме и в гепатоцитах. AgNPs введены в/б. $\alpha 2\text{MG}$ связывает AgNPs или наносеребро. $\alpha 2\text{MG}$ является основным ингибитором протеиназ, он улавливает, захватывает и расщепляет протеиназы различных классов (Sottrup-Jensen et al., 1984). Расщепление протеиназ индуцирует конформационные изменения в комплексе $\alpha 2\text{MG}$ /протеиназа, который убирается из циркуляции с помощью печеночного рецептора, подобного рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP) эндоцитозом (Lillis et al., 2005). Это обеспечивает доставку AgNPs в эндолизосомальное пространство. Там, при кислых значениях pH, наносеребро диссоциирует из комплекса и через CTR2, везикулярный транспортер меди, переносятся в цитозоль, где координируется апо-ATOX1, который передает их на ATP7B, перекачивающую $\text{Ag}(+)$ в люминальное пространство комплекса Гольджи, где $\text{Ag}(+)$ включаются в секреторный ЦП.

6. Пути выведения наносеребра из организма мышей

Скорость очищения организма от серебра наночастиц была оценена по снижению его концентрации после отмены инъекций AgNPs в печени, моче и желчи (Рис. 16). В печени мышей, обработанных AgNPs, потеря серебра наночастиц разного размера происходила примерно с одинаковой скоростью (Рис. 16А). Только через неделю после

отмены инъекций AgNPs в печени мышей всех экспериментальных групп концентрация серебра снижалась достоверно, но полного очищения не наблюдали ни для одного типа AgNPs в течение месяца после отмены инъекций. В образцах мочи мышей, обработанных AgNPs, независимо от размера наночастиц, на 7 день было найдено серебро примерно в концентрации 20 мкг/л, что превышало фоновое значение (1 – 2 мкг/л) почти в 10 раз (Рис. 16Б). В желчи этих мышей концентрация серебра достигала 200 – 300 мкг/л (Рис. 16В). Результаты показывают, что, подобно меди (Mason, 1979), основная масса серебра экскретируется через желчь. Концентрация меди в желчи у контрольных мышей составляла примерно 300 мкг/л. Эта величина незначительно снижалась у мышей, обработанных AgNPs.

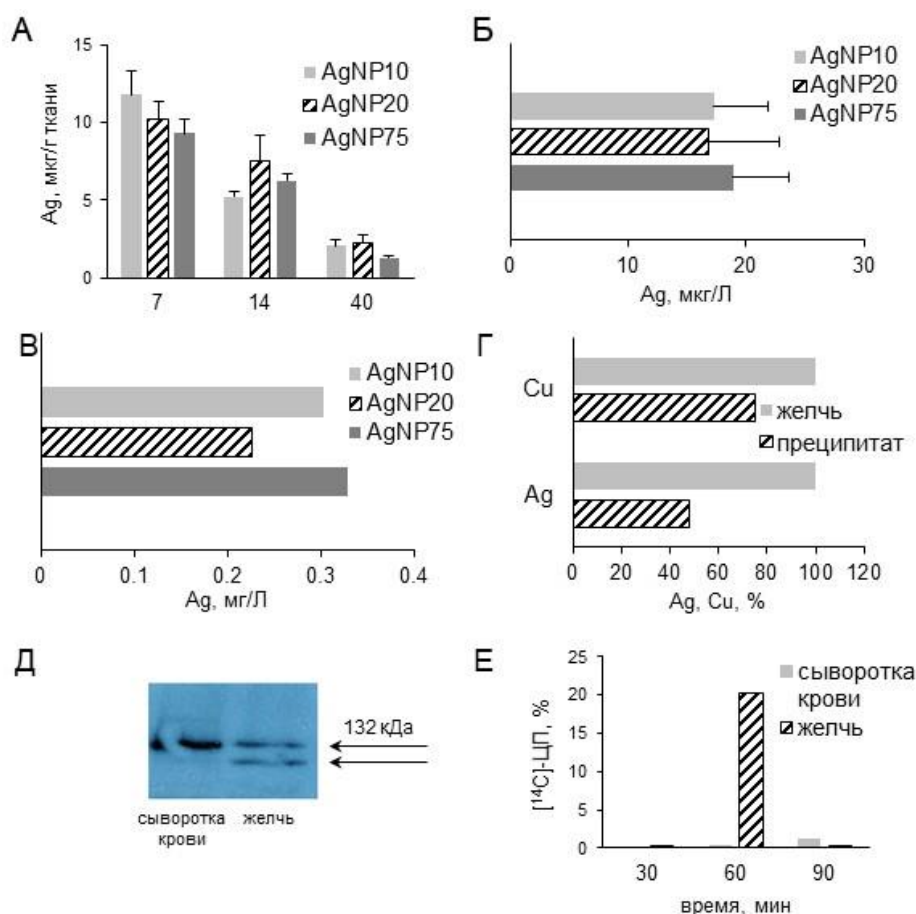


Рисунок 16. Серебро AgNPs выводится через желчь и мочу. Концентрация серебра в печени (А), моче (Б) и желчи (В). (Г) Доля меди и серебра в желчи, ассоциированная с ЦП (%). (Д) Иммуноблоттинг образцов после электрофореза в нативном 8% ПААГ. Стрелкой (132 кДа) показано положение сывороточного ЦП, обладающего оксидазной активностью, стрелкой без обозначения – положение «ЦП желчи». (Е) Динамика появления $[^{14}\text{C}]$ -ЦП в сыворотке крови и желчи.

Известно, что в желчи человека и крысы присутствует ЦП, который, возможно, принимает участие в экскреции меди (Verbina 1992; Chowrimootoo, 1996). Чтобы проверить, связано ли серебро, обнаруживаемое в желчи, с ЦП, мы измерили концентрацию серебра в преципитатах ЦП. На рисунке 16Г показано, что с ЦП желчи связано примерно половина меди и серебра, присутствующих в образцах желчи. Иммуноблоттинг с использованием электрофореза в неденатурирующих условиях выявил в желчи 2 молекулярные формы ЦП (Рис. 16Д). Одна из них соответствует сывороточному ЦП, другая в сыворотке не обнаруживается.

У мышей, получивших меченые аминокислоты, через 30 мин в иммунопреципитатах из сыворотки крови и желчи радиоактивный ЦП не обнаруживается (Рис. 16Е). Через 60 мин в желчи почти 20% от общей радиоактивности принадлежит ЦП, в сыворотке крови появляются только следы меченого ЦП, но в следующие 30 мин (90 мин чейза) его количество увеличивается почти в 5 раз. На этом сроке меченый ЦП в желчи не выявляется. Это хорошо согласуется с данными о скорости секреции белка, полученными *in vivo* на крысах, культивируемых клетках HepG2 и клетках яичника китайского хомячка, трансфицированных плазмидой, несущей структурную часть гена ЦП (*Ileychova et al., 2017; Hellman et al., 2002,*). В желчи [¹⁴C]-ЦП появляется через 60 мин. В крови меченый ЦП составляет около 2% от общей радиоактивности, что примерно соответствует доли ЦП. В желчи ЦП, по-видимому, является мажорным белком, секретируемым гепатоцитами в желчь. Данные, полученные в эксперименте пульс-чейз типа, показывают, что в желчи присутствует [¹⁴C]-полипептиды ЦП, секретирующегося в желчь с более высокой скоростью, чем [¹⁴C]-ЦП, секретирующийся в кровотоки (Рис. 16Е).

В заключении можно подчеркнуть, что AgNPs настолько вошли в жизнь и хозяйственную деятельность человека, что представляется маловероятной возможность отказаться от их использования. Многие области применения AgNPs предусматривают прямой контакт человека с ними. Поэтому важным является изучение *in vivo* биологической активности AgNPs в отношении млекопитающих, которое существенно отстает от исследований *in vitro*. Наша работа сфокусирована на возможном вмешательстве AgNPs в метаболизм меди. Такое вмешательство предусматривает, что в организме AgNPs химически трансформируются в Ag(+) и часть этих ионов включается в метаболизм. Учитывая, что распространенные нейродегенеративные заболевания характеризуются снижением показателей статуса меди, нельзя рассматривать биоактивность AgNPs как *in vivo* нейтральный фактор, но скорее, как «Троянского коня» (*Souza et al., 2018*). С другой стороны, AgNPs могут быть использованы для контролируемого снижения показателей статуса меди в случаях, когда это может способствовать снижению биодоступной меди для процессов неоваскуляризации в опухолях (*Babich et al., 2013*), или ограничения репродукции вируса гриппа (*Rupp et al., 2017*).

ВЫВОДЫ

1. Ионы Ag(+), продуцируемые AgNPs, поглощаются клетками печени и включаются в ЦП, образуя Ag-ЦП, не обладающий оксидазной активностью. Ag-ЦП секретируется в кровотоки, в результате показатели статуса меди снижаются. Ионы серебра не влияют на экспрессию гена ЦП.
2. Абсорбированное серебро наночастиц по кровотоку транспортируется в комплексе с a2MG.
3. Очищение организма мышей от серебра наночастиц осуществляется, в основном, через желчь. В желчи ионы Ag(+) ассоциированы с ЦП.
4. Чем меньше линейный размер AgNPs, тем эффективнее их антибактериальные свойства и тем меньше выражена их способность влиять на метаболизм меди млекопитающих.
5. Несферические AgNPs в 1000 раз эффективнее как антибактериальные препараты, по сравнению со сферическими того же линейного размера, и не отличаются по способности вмешиваться в метаболизм меди.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. Sankova TP, Sosnin IM, Karpenko MN, Ilyechova EY, Orlov YA, Polyakov DS, **Skomorokhova EA**, Sukhanova AS, Rozhkova NA, Babich PS, Kudryavtseva PS, Shafeev MR, Romanov AE, Puchkova LV. On the biological activity of silver nanoparticles. *Materials Physics and Mechanics*. 2015;3(24):289-296.
2. Ильичева Е.Ю., Канаш Л.А., Тимирова З.Р., Цымбаленко Н.В., Орлов Ю.А., Ключева Н.Н., **Скоморохова Е.А.**, Денисенко А.Д., Пучкова Л.В. Особенности метаболизма меди у крыс, содержащихся на низко- или высококалорийном рационе. *Вопросы питания*. 2019;88(1):44-51.
3. Ilyechova EY, Bonaldi E, Orlov IA, **Skomorokhova EA**, Puchkova LV, Brogginini M. CRISP-R/Cas9 Mediated Deletion of Copper Transport Genes CTR1 and DMT1 in NSCLC Cell Line H1299. Biological and Pharmacological Consequences. *Cells*. 2019;8(4):322.

Тезисы конференций

1. **Скоморохова ЕА**. Распределение наночастиц серебра в отделах мозга при различных способах введения. 20-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века", г. Пушино, 2016 г., с. 187. Устный доклад.
2. **Skomorokhova EA**, Muruzheva ZM, Ilyechova EYu, Karpenko MN. Intranasal exposure to silver nanoparticles (SNP) in rats induce silver deposition in the striatum. 16th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals, Saint-Petersburg, Russia, 2017. *J. Trace Elements Med. Biol.* V. 41S, P. 13, 2017. Устный доклад.
3. Orlov IA, **Skomorokhova EA**, Ilyechova EY. Silver distribution through body of the rats after intraperitoneal, intranasal and intracerebral administration of silver nanoparticles. 6th International Symposium Federation of European Societies on Trace Elements and Minerals, Catania, Italy, 2016. p. 120. Устный доклад.
4. Ilyechova EYu, Sankova TP, Orlov IA, Sosnin IM, Kirilenko DA, **Skomorokhova EA**, Puchkova LV. Influence of silver nanoparticles (SNPs) with different size and shape on copper status in mice. 43rd FEBS Congress, Czech Republic, Prague, 2018. *FEBS Open Bio*, Vol. 8, pp. 480-480 <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12453>.
5. Ilyechova EY, Bonaldi E, Orlov IA, **Skomorokhova EA**, Puchkova LV, Brogginini M. Copper metabolism shift in H1299 cells deficient in expression of the CTR1 and DMT1 genes. 44th *FEBS* Congress, Krakow, Poland, 2019. *FEBS Open Bio*. Vol. 9: P-38-017. doi:10.1002/2211-5463.12675.
6. **Скоморохова ЕА**, Ильичева ЕЮ. Действие сферических наночастиц серебра различного диаметра на бактерии и млекопитающих. 23-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых "Биология - наука XXI века", г. Пушино, 2019 г., с. 183. Устный доклад.
7. **Скоморохова ЕА**, Орлов ЮА, Пучкова ЛВ, Ильичева ЕЮ. Зависимость биологической активности наночастиц серебра от их формы. IV Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием "Медико-биологические аспекты химической безопасности". Биомедицинский журнал «Medline.ru», Санкт-Петербург, пос. Рошино, 2020 г. Устный доклад.