

# БИОХИМИЯ BIOCHEMISTRY

## ВЛИЯНИЕ АЦЕТАТА МЕДИ НА МЕТАБОЛИЗМ ГЕПАТОЦИТОВ *IN VITRO*

Трухан И.С.,  
Дремина Н.Н.,  
Шурыгина И.А.

ФГБНУ «Иркутский научный центр  
хирургии и травматологии» (664003,  
г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1,  
Россия)

Автор, ответственный за переписку:

Трухан Ирина Сергеевна,  
e-mail: predel4@yandex.ru

### РЕЗЮМЕ

**Обоснование.** Ионы меди необходимы для поддержания базовых физиологических процессов в организме млекопитающих. Однако их избыточное поглощение или накопление в клетках может приводить к развитию или обострению различных патологических процессов. Цитотоксическое и генотоксическое воздействие высоких концентраций соединений меди в настоящее время хорошо изучено на различных клеточных культурах, тогда как влияние нетоксичных количеств ионов меди на физиологические процессы в клетках, в том числе в ходе их культивирования, исследовано крайне слабо.

**Цель исследования.** Изучить влияние ионов меди на изменения внутриклеточного содержания митохондриальной цитохром-С-оксидазы и глутатионсинтетазы.

**Методы.** Была получена первичная культура гепатоцитов, которую в течение суток подвергали воздействию ацетатом меди в концентрации 200 мкг/мл в пересчёте на содержание меди. После фиксации образцы окрашивали иммуноцитохимически с использованием антител к субъединице I цитохром-С-оксидазы (CсO) и глутатионсинтетазе (GS).

**Результаты.** Было продемонстрировано статистически значимое увеличение интенсивности флуоресцентной окраски обоих анализируемых ферментов как после 6 ч, так и после 24 ч воздействия ионами меди, что свидетельствует об изменении их количества в клетках. При этом увеличение количества CсO было более интенсивным в первые 6 ч инкубации с микроэлементом, тогда как в последующие 18 ч изменения во внутриклеточном содержании CсO носили менее выраженный характер. В то же время повышение интенсивности флуоресцентной окраски GS было более активным и наблюдалось на протяжении всего времени культивирования.

**Заключение.** Из полученных результатов можно сделать выводы о том, что ионы меди в нетоксичной концентрации могут влиять на ключевые показатели жизнеспособности клеток в культуре, изменяя количество одного из основных ферментов энергетического обмена и фермента, обеспечивающего синтез важнейшего низкомолекулярного антиоксиданта глутатиона.

**Ключевые слова:** культура гепатоцитов, ацетат меди, цитохром-С-оксидаза, глутатионсинтетаза

Статья поступила: 17.10.2024

Статья принята: 06.12.2024

Статья опубликована: 28.12.2024

**Для цитирования:** Трухан И.С., Дремина Н.Н., Шурыгина И.А. Влияние ацетата меди на метаболизм гепатоцитов *in vitro*. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(6): 12-21. doi: 10.29413/ABS.2024-9.6.2

THE EFFECT OF COPPER ACETATE ON HEPATOCYTE METABOLISM *IN VITRO*

Trukhan I.S.,  
Dremina N.N.,  
Shurygina I.A.

Irkutsk Scientific Centre of Surgery  
and Traumatology  
(Bortsov Revolyutsii str. 1, Irkutsk 664003,  
Russian Federation)

Corresponding author:  
Irina S. Trukhan,  
e-mail: predel4@yandex.ru

## ABSTRACT

**Background.** Copper ions are necessary for maintaining basic physiological processes in the mammalian organism. However, their excessive absorption or accumulation in cells can lead to the development or exacerbation of various pathological processes. The cytotoxic and genotoxic effects of high concentrations of copper compounds are currently well studied in various cell cultures, whereas the effect of non-toxic amounts of copper ions on physiological processes in cells, including during their cultivation, has been extremely poorly studied.

**The aim of the study.** To investigate the effect of copper ions on changes in the intracellular amount of mitochondrial cytochrome C oxidase and glutathione synthetase.

**Materials and methods.** A primary culture of hepatocytes was obtained, which was exposed to copper acetate at a concentration of 200 µg/ml in terms of copper content for 24 hours. After fixation, the samples were stained immunocytochemically using antibodies to cytochrome C oxidase (CcO) subunit I and glutathione synthetase (GS).

**Results.** In hepatocyte culture, a significant increase in the intensity of fluorescent staining of the two analyzed enzymes was demonstrated both after 6 hours and after 24 hours of exposure to copper ions, which indicates a change in their number in cells. At the same time, the increase in the amount of CcO was more intense in the first 6 hours of incubation with a microelement, whereas in the next 18 hours, changes in the intracellular content of CcO were less pronounced. The increase in the intensity of the GS fluorescent stain was more active and was observed throughout the entire cultivation period.

**Conclusion.** From the results obtained, it can be concluded that copper ions in non-toxic concentrations are able to influence key indicators of cell viability in culture by changing the amount of one of the main energy metabolism enzymes and the enzyme that provides synthesis of the most important low-molecular anti-oxidant glutathione.

**Key words:** hepatocyte culture, copper acetate, cytochrome C oxidase, glutathione synthetase

Received: 17.10.2024  
Accepted: 06.12.2024  
Published: 28.12.2024

**For citation:** Trukhan I.S., Dremina N.N., Shurygina I.A. The effect of copper acetate on hepatocyte metabolism *in vitro*. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(6): 12-21. doi: 10.29413/ABS.2024-9.6.2

## ВВЕДЕНИЕ

Медь является одним из основных микроэлементов, необходимых млекопитающим для нормального развития. Известно, что взрослый человек потребляет в среднем от 0,6 до 1,6 мг меди в сутки при общем уровне всасывания элемента в кишечнике 20–75 %. При этом для взрослого человека безопасной суточной дозой этого микроэлемента считается 10–12 мг [1]. Благодаря способности находиться в двух окислительно-восстановительных состояниях ионы меди могут выполнять роль каталитических кофакторов для различных ферментов, к которым относятся цитохром-С-оксидаза, один из ключевых ферментов окислительного фосфорилирования; супероксиддисмутаза, тирозиназа и глутатионсинтаза, участвующие в антиоксидантной защите клеток; фосфодиэстераза 3В, обеспечивающая липолиз; ферроксидаза, необходимая для поглощения железа; бета-гидроксилаза дофамина, катализирующая синтез норадреналина из дофамина; лизилоксидаза, участвующая в ремоделировании тканей [2]. Кроме того, активность некоторых ферментов, для выполнения каталитических функций которых  $\text{Cu}^{2+}$  не требуется, может модулироваться ионами меди. Примерами таких ферментов, активность которых связана с содержанием ионов меди в клетке, являются некоторые киназы, в том числе MAP2K1/MEK1 и MAP2K2 (mitogen-activated protein kinase 1, 2), ULK1 и ULK2 (unc-51 like autophagy activating kinase 1, 2), PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1), а также факторы транскрипции TP53/p53 [2]. Это свидетельствует о том, что данный микроэлемент необходим для основных физиологических процессов, обеспечивающих жизнедеятельность клетки, и его недостаток в организме может приводить к развитию патологических состояний.

Тем не менее, нарушение гомеостаза меди в сторону избыточного поглощения или накопления в клетках этого элемента также может стать причиной развития различных заболеваний или вызвать обострение патологических процессов. Так, высокое содержание ионов меди было обнаружено в бета-амилоидных бляшках, являющихся одним из основных признаков болезни Альцгеймера [3]. Высокие уровни меди в сыворотке крови были описаны при различных видах рака, таких как рак молочной железы, лёгких, печени, предстательной железы, полости рта, щитовидной железы, колоректальный рак [3]. Однако, несмотря на то, что поступление избыточных количеств меди может вызывать нарушение функций всех систем жизнедеятельности, органом, который несёт наибольшую токсическую нагрузку при патологическом накоплении меди в организме, является печень. Известно, что хронический медный токсикоз может приводить к дегенерации печени, циррозу и в наиболее тяжёлых случаях вызывать гибель пациента. Нарушения в функционировании печени и повреждение токсического характера также описаны при болезни Вильсона – Коновалова, генетическом заболевании, связанном с нарушением механизмов выведения меди из организма и характеризующимся преимущественным накоплением этого микроэлемента в печени [3, 4].

Это связано с тем, что печень в организме млекопитающих играет ключевую роль в перераспределении, депонировании и выведении данного элемента. В норме печень взрослого человека накапливает от 18 до 55 мкг меди на грамм сухого веса и наряду с мозгом и почками относится к органам, содержащим наибольшее количество этого элемента [1, 5]. При этом основным путём выведения меди в физиологических условиях является экскреция данного микроэлемента в составе желчи – на его долю приходится до 80 % меди, удаляемой печенью [6].

В настоящее время на различных культурах клеток, в том числе на гепатоцитах и клетках гепатомы, активно изучаются свойства соединений меди или наноконпозитов на основе меди, связанные с цитотоксическими или генотоксическими эффектами [7, 8], способностью ионов меди запускать такие процессы, как окислительный стресс [7, 9, 10] стресс эндоплазматического ретикулума [7, 11], перекисное окисление липидов, приводящее к повреждению мембран [8, 9], агрегацию белков [5, 7, 8], нарушение активности митохондрий и митофагию [9–12], аутофагию [10, 11], апоптоз, купроптоз и другие виды клеточной гибели [7, 9, 12, 13]. В работах исследователей по всему миру особое внимание уделяется возможности применения соединений на основе меди для борьбы с раковыми заболеваниями, что определяется их цитотоксическими свойствами в отношении карциномных клеток [13, 14]. При этом практически отсутствуют исследования, затрагивающие влияние нетоксичных количеств ионов меди на физиологические процессы, происходящие в клетках, в том числе в ходе культивирования.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследование влияния ионов меди на изменения внутриклеточного содержания митохондриальной цитохром-С-оксидазы, играющей основную роль в окислительном фосфорилировании, и глутатионсинтазы, обеспечивающей синтез антиоксиданта глутатиона.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 1. Выделение первичной культуры гепатоцитов крысы

Первичная культура гепатоцитов была получена перфузионным методом с некоторыми модификациями [15, 16]. Для этого был проведён острый эксперимент на крысе линии Wistar весом 200 г (самец), содержащейся в условиях вивария. Эксперимент был выполнен в соответствии с правилами гуманного обращения с животными. Исследование одобрено комитетом по этике ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии» (протокол № 9 от 16.12.2021). Все оперативные вмешательства проводились в асептических условиях, в качестве наркоза внутримышечно использовали 0,7 мл 5%-го раствора телозола в фосфатном буфере

(PBS, phosphate-buffered saline) и хлороформ ингаляционно до потери двигательной активности, но с сохранением сократительной активности сердечной мышцы. Перфузию печени проводили через воротную вену 1 мл раствора гепарина (Lek, Беларусь) в количестве 500 ед. в 0,9%-м NaCl, затем раствором буфера Кребса-Рингера с ЭДТА без кальция (pH=7,2–7,4; 37 °C) общим объемом 210 мл со скоростью 30 мл/мин. Далее вводили 120 мл раствора коллагеназы 0,07 % (Sigma-Aldrich, США) в буфере Хэнкса с ионами кальция и магния (HBSS, Hanks' balanced salt, Sigma-Aldrich, США) при температуре 37 °C. После удаления печень переносили в охлажденный до 4 °C буфер Хэнкса, печеночную капсулу вскрывали, извлеченные клетки фильтровали через клеточный фильтр с размерами пор 70 мкм (Corning, BioCoat, США) и промывали с последующим центрифугированием в буфере Хэнкса при 50 g и 4 °C в течение 5 мин. Клетки ресуспендировали в питательной среде William's E без глутамина (Gibco; Thermo Fisher Scientific, США) в сочетании с 10%-й эмбриональной бычьей сывороткой (FBS, fetal bovine serum; Sigma-Aldrich, США) и дополненной составом Primary Hepatocyte Maintenance Supplements (Gibco; Thermo Fisher Scientific, США), содержащим Dexamethasone (0,14 мкл 10 мМ раствора на 1 мл среды) и Cell Maintenance Cocktail-B (GlutaMAX™, HEPES, пенициллин-стрептомицин, инсулин, трансферрин, комплекс селена, BSA и линолевая кислота, 40 мкл на 1 мл среды). Культуру гепатоцитов инкубировали при температуре 37 °C, влажности 90 % и 5 % CO<sub>2</sub> в BioStation CT (Nikon, Япония). Клетки вводили в эксперимент в течение 24 ч после выделения.

## 2. Инкубация культуры гепатоцитов крысы с CuAc<sub>2</sub>

Через 2 ч после замены питательной среды и удаления погибших гепатоцитов к клеткам в культуральную среду добавили раствор ацетата меди (CuAc<sub>2</sub>) до конечной концентрации 200 мкг/мл в пересчете на содержание меди (концентрация подобрана в ходе предварительных исследований на токсичность). Эксперимент проводили в трёх повторностях. Контролем служила культура гепатоцитов без добавления CuAc<sub>2</sub>, в культуру вносили соответствующее количество питательной среды. Через 6 и 24 ч из соответствующих лунок удаляли питательную среду, клетки фиксировали 70%-м спиртом в течение 1 часа.

## 3. Иммуофлюоресцентные исследования

Иммуоцитохимическое окрашивание фиксированных клеток проводили с первичными антителами к субъединице I цитохром-С-оксидазы (Invitrogen, США; Cat. № NA-0589) и глутатионситаза (Abcam, Великобритания; Cat. № ab133592) в разведении 1:200 в течение часа и с вторичными антителами Alexa Fluor 568 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen, США; Cat. № NA-11031) и Alexa Fluor 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, США; Cat. № NA-11034) в разведении 1:300 в течение 0,5 часа. Ядра окрашивали при помощи Hoechst (Invitrogen, США; Cat. № NH-3570) в разведении 1:300.

Интенсивность окраски на препаратах оценивали при помощи программного обеспечения Nis-Elements AR 5.00 (Nikon, Япония), при этом анализировали не менее 8 изображений для каждого образца. Статистический анализ проводили в среде программирования R с использованием критерия Уилкоксона – Манна – Уитни.

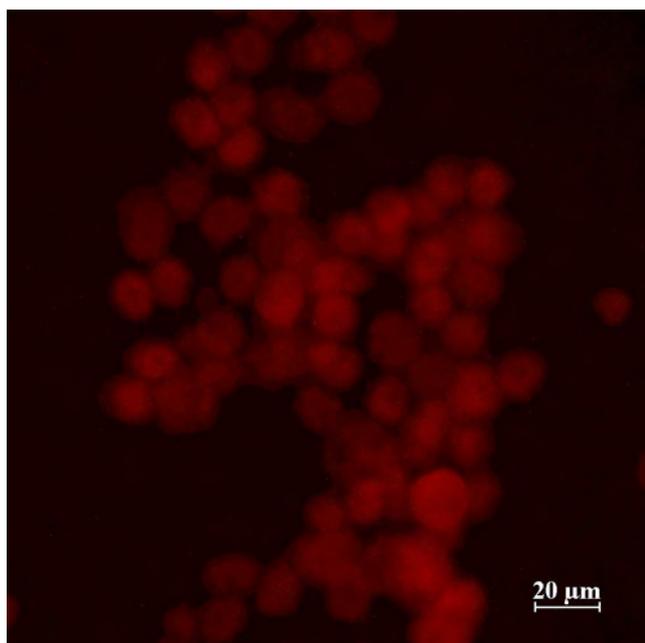
Исследование проведено на оборудовании из ЦКП «Диагностические изображения в хирургии» ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии».

## РЕЗУЛЬТАТЫ

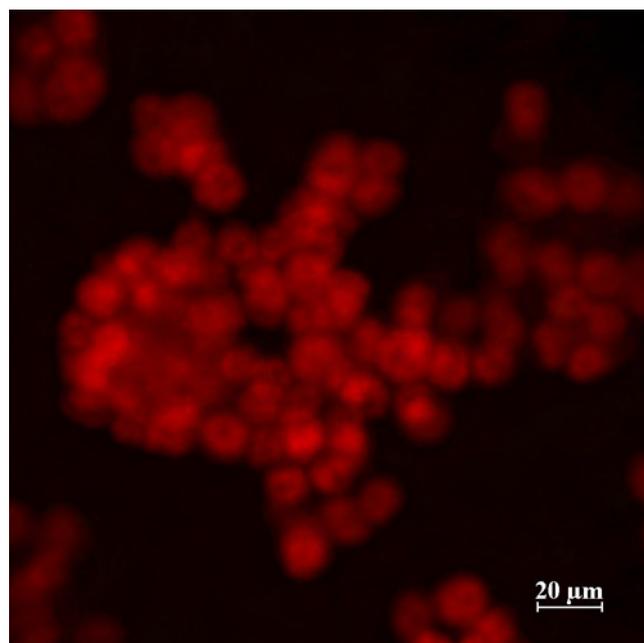
В качестве объектов для изучения внутриклеточных изменений, происходящих в гепатоцитах в условиях насыщенной ионами меди среды, были выбраны ферменты цитохром-С-оксидаза и глутатионситаза. Это объясняется тем, что, с одной стороны, медь для данных ферментов является кофактором и, следовательно, оказывает непосредственное влияние на уровень их активности, а с другой стороны, изменения в содержании данных ферментов превосходно отражают наиболее важные показатели жизнеспособности клеток, такие как интенсивность энергетического обмена и способность к антиоксидантной защите.

Первый анализируемый фермент цитохром-С-оксидаза представляет собой митохондриальную гем-медную терминальную оксидазу, выполняющую роль конечного акцептора в цепи переноса электронов, необходимого для производства аденозинтрифосфата и восстановления молекулярного кислорода в процессе окислительного фосфорилирования [6]. В нашем исследовании иммуоцитохимическое окрашивание с применением специфичных антител позволило продемонстрировать повышение интенсивности флуоресценции CcO в гепатоцитах под действием ионов меди в концентрации 200 мкг/мл (рис. 1, 2). Для работы была выбрана наибольшая нетоксичная концентрация, подобранная в ходе предварительных исследований на токсичность (данные не приводятся). При этом статистически значимое увеличение количества визуализируемого фермента по сравнению с контрольными образцами наблюдалось как после 6 часов инкубации клеток с ацетатом меди, так и после 24 часов культивирования с данным микроэлементом (рис. 2). В первом случае зафиксированное повышение интенсивности флуоресценции в среднем составило 25 %, после инкубации клеток с CuAc<sub>2</sub> на протяжении суток – 23 % по сравнению с контрольной группой (рис. 2).

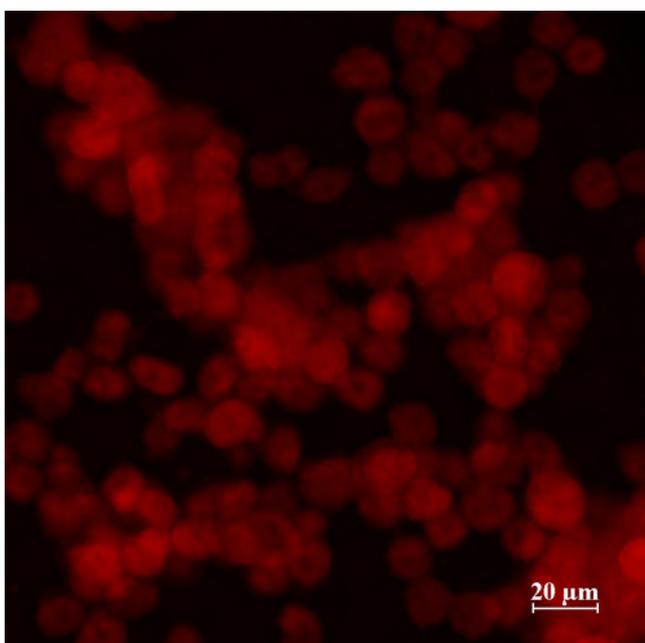
Из графика, представленного на рисунке 3, видно, что повышение интенсивности флуоресцентной окраски в основной группе наблюдается на протяжении всего эксперимента. При этом в сравнении с контрольной группой можно судить о том, что увеличение количества фермента под действием ионов меди было более интенсивным в первые 6 ч инкубации с микроэлементом, тогда как в последующие 18 ч изменения во внутриклеточном содержании CcO носили менее выраженный характер и соответствовали таковым в контрольных образцах (рис. 3). Наблюдаемое незначительное повышение CcO (в пределах 10 %) в культивируемых гепатоцитах в кон-



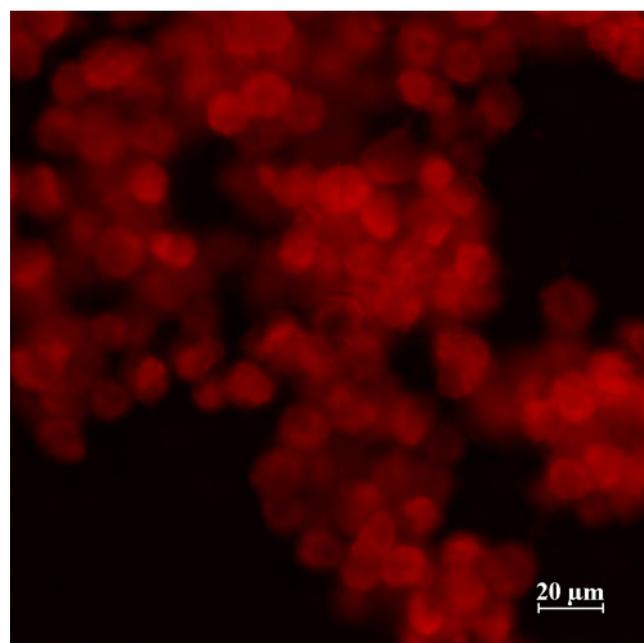
а



б



в



г

**РИС. 1.**

Иммунофлуоресцентная окраска (Alexa Fluor 568) субъединицы I цитохром-С-оксидазы после 6 ч (а, в) и 24 ч (б, г) инкубации в контрольных образцах (а, б) и образцах, обработанных ацетатом меди в концентрации 200 мкг/мл (в, г)

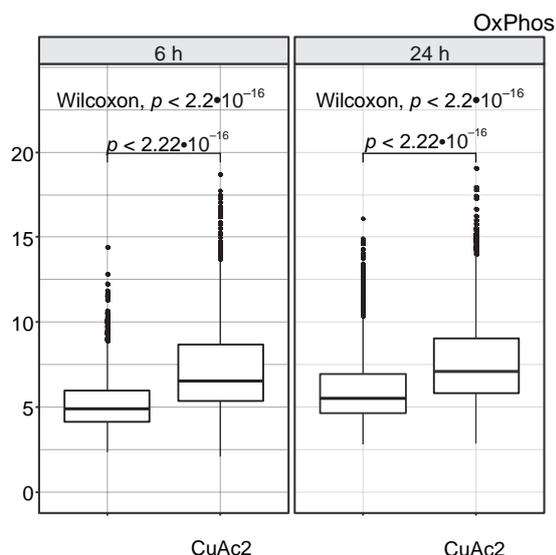
**FIG. 1.**

Immunofluorescence staining (Alexa Fluor 568) of cytochrome C oxidase subunit I after 6 hours (а, в) and 24 hours (б, г) of incubation in control samples (а, б) and samples treated with copper acetate at a concentration of 200 μg/ml (в, г)

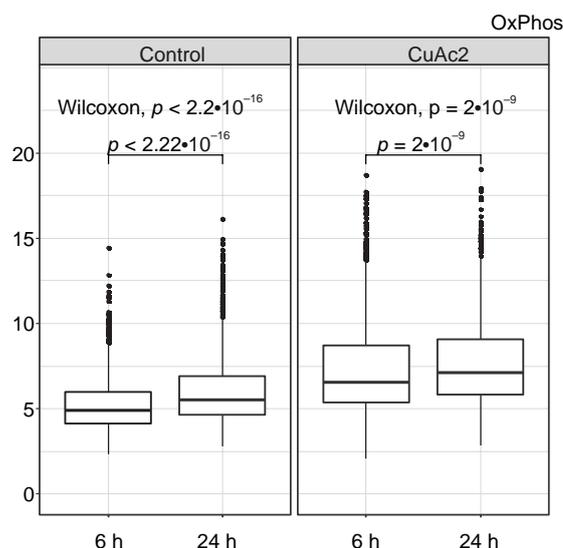
трольной группе может объясняться стимулирующим действием питательной среды в сочетании с FBS, богатой как аминокислотами, витаминами и нуклеотидами, так и активными молекулами, способными модулировать экспрессию ядерных и митохондриальных генов [17, 18].

Второй исследуемый в данной работе фермент глутатионсинтетаза участвует в синтезе внутриклеточного антиоксиданта глутатиона, обеспечивая присоеди-

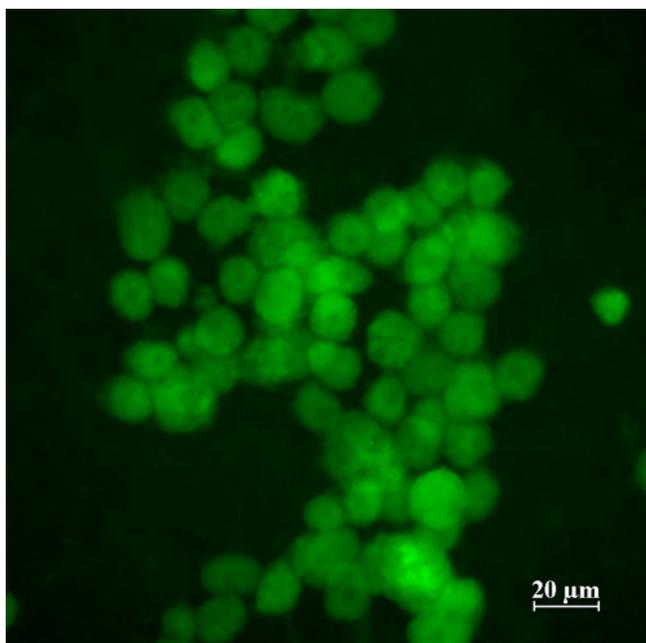
нение глицина к γ-глутамилцистеину [19]. Нами установлено, что интенсивность флуоресцентной окраски, соответствующей количеству GS в культивируемых гепатоцитах, также возрастала на протяжении всего времени инкубации с ацетатом меди (рис. 4, 5), демонстрируя в среднем повышение на 30 % в первые 6 ч воздействия на клетки  $\text{CuAc}_2$  и на 33 % в последующие 18 ч эксперимента в сравнении с контрольными образцами (рис. 5).



**РИС. 2.** Изменения интенсивности флуоресцентной окраски цитохром-С-оксидазы в культуре гепатоцитов после 6 и 24 ч воздействия ацетатом меди в сравнении с контрольной группой: представлены медианы, 1-е и 3-и квартили; статистически значимыми считаются различия при  $p < 0,05$   
**FIG. 2.** Changes in the intensity of the cytochrome C oxidase fluorescent staining in hepatocyte culture after 6 and 24 hours of exposure to copper acetate compared to the control group: the medians, first and third quartiles are presented; the differences are considered statistically significant at  $p < 0.05$

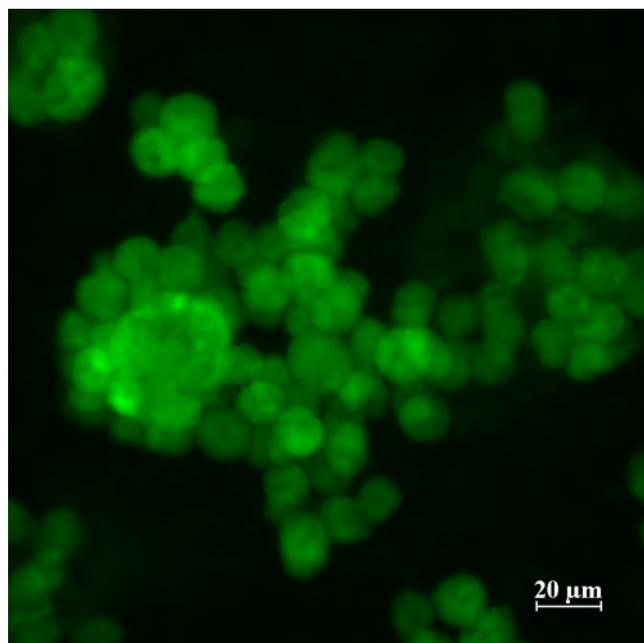


**РИС. 3.** Изменения интенсивности флуоресцентной окраски цитохром-С-оксидазы в культуре гепатоцитов после 6 и 24 ч культивирования в контрольной группе и в образцах, инкубируемых с ацетатом меди: представлены медианы, 1-е и 3-и квартили; статистически значимыми считаются различия при  $p < 0,05$   
**FIG. 3.** Changes in the intensity of the cytochrome C oxidase fluorescent staining in hepatocyte culture after 6 and 24 hours of cultivation in the control group and in the samples incubated with copper acetate: the medians, first and third quartiles are presented; the differences are considered statistically significant at  $p < 0.05$



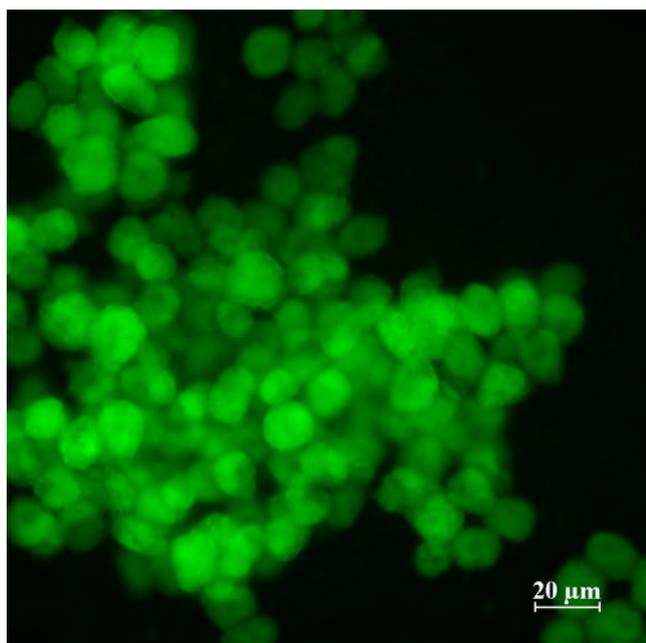
**а**

**РИС. 4.** Иммунофлуоресцентная окраска глутатионсинтетазы (Alexa Fluor 488) после 6 ч (**а, в**) и 24 ч (**б, г**) инкубации в контрольных образцах (**а, б**) и образцах, обработанных ацетатом меди в концентрации 200 мкг/мл (**в, г**)

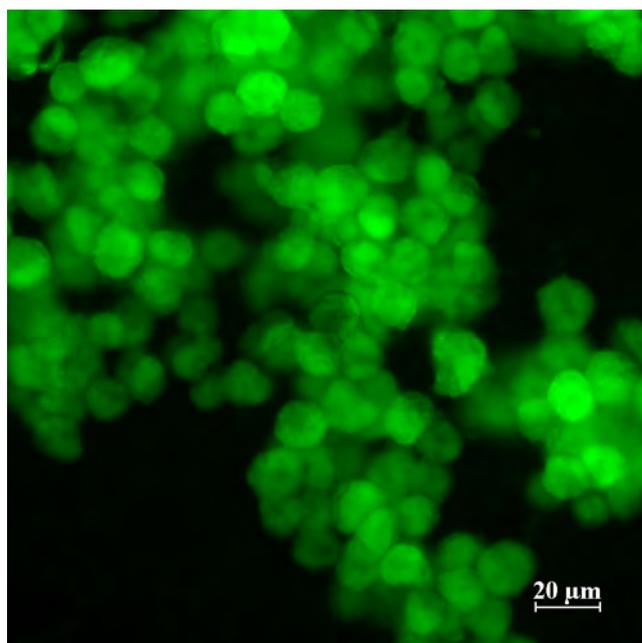


**б**

**FIG. 4.** Immunofluorescence staining of glutathione synthetase (Alexa Fluor 488) after 6 hours (**а, в**) and 24 hours (**б, г**) of incubation in control samples (**а, б**) and samples treated with copper acetate at a concentration of 200  $\mu\text{g/ml}$  (**в, г**)



**а**



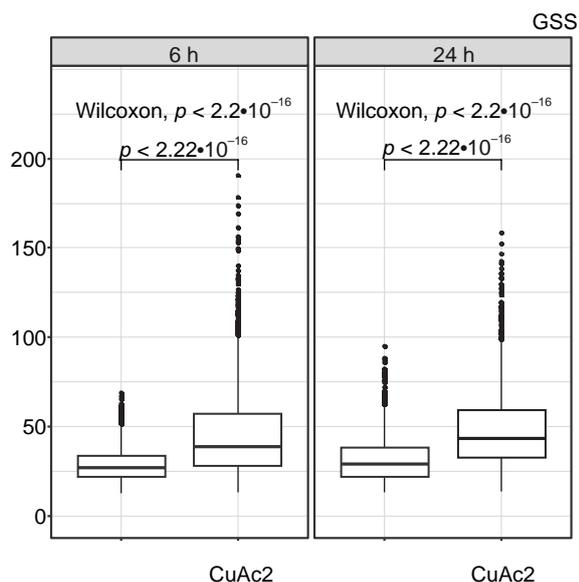
**б**

**РИС. 4.** (продолжение)

Иммунофлуоресцентная окраска глутатионсинтетазы (Alexa Fluor 488) после 6 ч (**а**, **в**) и 24 ч (**б**, **г**) инкубации образцов, обработанных ацетатом меди в концентрации 200 мкг/мл (**в**, **г**)

**FIG. 4.** (continued)

Immunofluorescence staining of glutathione synthetase (Alexa Fluor 488) after 6 hours (**а**, **в**) and 24 hours (**б**, **г**) of incubation in samples treated with copper acetate at a concentration of 200 μg/ml (**в**, **г**)

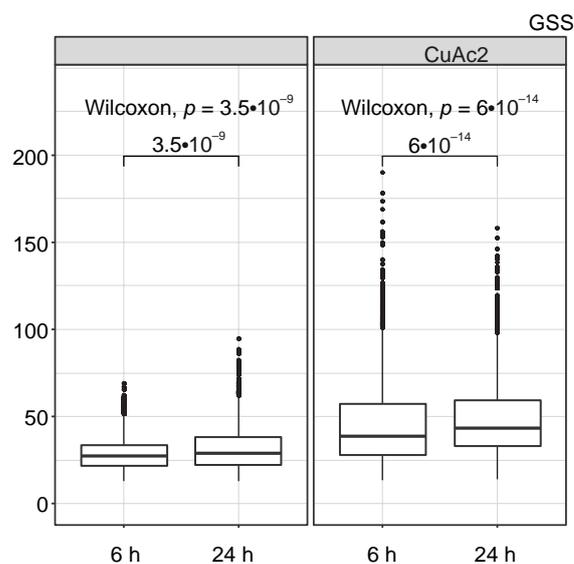


**РИС. 5.**

Изменения интенсивности флуоресцентной окраски глутатионсинтетазы в культуре гепатоцитов после 6 и 24 ч воздействия ацетатом меди в сравнении с контрольной группой: представлены медианы, 1-е и 3-и квартили; статистически значимыми считаются различия при  $p < 0,05$

**FIG. 5.**

Changes in the intensity of the glutathione synthetase fluorescent staining in hepatocyte culture after 6 and 24 hours of exposure to copper acetate in comparison with the control group: the medians, first and third quartiles are presented; the differences are considered statistically significant at  $p < 0.05$



**РИС. 6.**

Изменения интенсивности флуоресцентной окраски глутатионсинтетазы в культуре гепатоцитов после 6 и 24 ч культивирования в контрольной группе и в образцах, инкубируемых с ацетатом меди: представлены медианы, 1-е и 3-и квартили; статистически значимыми считаются различия при  $p < 0,05$

**FIG. 6.**

Changes in the intensity of the glutathione synthetase fluorescent staining in hepatocyte culture after 6 and 24 hours of cultivation in the control group and in the samples incubated with copper acetate: the medians, first and third quartiles are presented; the differences are considered statistically significant at  $p < 0.05$

Однако, несмотря на то, что повышение интенсивности флуоресцентной окраски на протяжении суток наблюдалось и в контрольных образцах, и в основной группе (рис. 6), в отличие от СсО, в экспериментальных образцах рост интенсивности окраски GS почти в 2 раза превышал аналогичный показатель в контрольной группе (11 % и 6,5 % соответственно). Известно, что экспрессия ферментов, участвующих в синтезе глутатиона, может положительно регулироваться аминокислотами, входящими в состав этого трипептида, а именно цистеином, глицином и глутамином [20, 21]. Все три аминокислоты входят в состав стандартных питательных сред, что может влиять на изменения в количестве визуализируемого в клетках фермента. В то же время тот факт, что рост интенсивности окраски в экспериментальной группе выше, чем в контрольных образцах, говорит о том, что в данном случае регуляция, зависящая от содержания кофактора фермента в среде, является более значимой для GS, чем регуляция, зависящая от количества субстрата.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то, что изучение влияния ионов меди на жизнеспособность клеток в культуре проводят на разных типах клеток, среди которых, помимо часто анализируемых гепатоцитов [7, 9, 12], используют эпителиальные клетки почечных канальцев [11], клетки крови [8], а также половые клетки [10], выбор в качестве мишени воздействия гепатоцитов в данном исследовании, по мнению авторов, наиболее оправдан и продиктован рядом причин. Основной из них является исключительная роль печени в метаболизме и распределении меди. Тот факт, что поступающая с пищей медь в организме млекопитающих транспортируется сначала в печень, из которой она перераспределяется в другие органы, в том числе в связанном с церулоплазмином виде, и избыточные количества меди также направляются в печень, говорит о том, что гепатоциты способны сохранять жизнеспособность без утраты основных функций в условиях высокого содержания меди. Кроме того, гепатоциты в организме отвечают за детоксикацию эндогенных и ксенобиотических соединений, что предполагает достаточно высокую лабильность клеточных систем, отвечающих за активацию метаболизма и защиту от окислительного стресса, нередко сопровождающего как поступление токсичных веществ в клетку, так и интенсификацию окислительных процессов в митохондриях [6, 18, 19]. Это предполагает, что изменения в интенсивности ключевых процессов жизнедеятельности в активно метаболизирующих клетках будут достаточно заметными, чтобы выявить их при помощи методов иммунофлуоресцентного окрашивания и микроскопии.

В нашем исследовании на гепатоцитах было продемонстрировано индуцируемое ионами меди увеличение количества митохондриального фермента цитохром-С-оксидазы, что свидетельствует о повышении интенсивности окислительного фосфорилирования в клетках. Известно, что основным внутриклеточным пулом ио-

нов меди являются митохондрии, при этом почти 25 % данного микроэлемента приходится на цитохром-С-оксидазу. Три атома металла связываются в каталитическом ядре СсО, образуя центры CuA и CuB в субъединицах COX2 и COX1 соответственно. Однако в данном случае, как было показано, ионы меди не только обеспечивают каталитическую активность фермента, но также играют ключевую роль в созревании и стабилизации основных субъединиц СсО, препятствуя их быстрой дегградации и обеспечивая таким образом формирование голофермента цитохром-С-оксидазы [18]. Кроме того, ранее было установлено, что дефицит меди может приводить к снижению экспрессии как ядерных, так и митохондриальных субъединиц цитохром-С-оксидазы [6, 22, 23], тогда как избыточное нецитотоксичное содержание меди в клетках вызывает противоположный эффект, приводя к повышению уровня экспрессии СсО [6, 24]. В изменениях уровня экспрессии генов могут быть задействованы факторы транскрипции NRF-1 и NRF-2 (nuclear respiratory factors 1, 2), а также Sp1 (specificity protein 1), которые непосредственно взаимодействуют с генами субъединиц СсО ядерного кодирования, а также регулируют транскрипцию митохондриальных генов СсО посредством активации митохондриальных факторов транскрипции А и В (TFAM, TFB1M и TFB2M) [25–27]. Исходя из свойств ионов меди модулировать активности митохондриальной СсО, в литературе широко обсуждается возможность регуляции окислительного фосфорилирования путём воздействия на клетки хелаторами либо, наоборот, внесением дополнительных количеств меди с целью изменения интенсивности клеточного метаболизма и внутриклеточных процессов, зависимых от энергетического обмена. Данный подход можно считать эффективным при разработке лекарственных препаратов, направленных, например, на лечение онкологических заболеваний путём хелатирования меди, а также в регенеративной медицине при регуляции таких процессов, как пролиферация и дифференциация клеток, посредством внесения дополнительного количества этого микроэлемента [6].

Роль глутатиона в клетках млекопитающих в целом и в митохондриях в частности не ограничивается его антиоксидантными функциями и зачастую тесно связана с обменом меди. Так, глутатион не только взаимодействует с активными формами кислорода и азота, к неконтролируемой генерации которых могут приводить избыточные количества ионов меди, и предотвращает агрегацию белков, вызванную также токсическим действием меди, но и считается одним из основных внутриклеточных хелаторов для этого микроэлемента наряду с металлотиенинами. Так, известно, что большая часть ионов меди (до 60 %) находится в клетках именно в связанной с глутатионом форме [3, 5]. Во многих исследованиях, в том числе и проведённых на культурах клеток, описано влияние ионов меди на количество глутатиона, в частности на содержание его восстановленной формы [8, 10, 11], однако работ, в которых однозначно была бы установлена роль меди в регуляции экспрессии глутатионсинтетазы млекопитающих, по-прежнему нет. Тем не менее регуля-

торный эффект был описан у бактерий *Acidithiobacillus ferrooxidans*, у которых воздействие медью приводит к повышению уровня экспрессии двух генов, кодирующих глутатионсинтезы [28]. Неоднозначные результаты были представлены в работах на клетках бычьей печени и печени овец, в которых была продемонстрирована и понижающая, и повышающая регуляция ионов меди на экспрессию гена GS в зависимости от концентрации вносимого в среду микроэлемента [29]. В нашем исследовании наблюдалось статистически значимое увеличение количества фермента, визуализируемое при помощи иммуноцитохимии, под действием ионов меди в концентрации 200 мкг/мл, при этом положительный эффект отмечался на протяжении всего времени воздействия.

Природа подобной регуляции, как и в случае СсО, остаётся дальнейшим предметом изучения. Она может быть связана с непосредственным взаимодействием атомов меди с металлочувствительными факторами транскрипции, как это установлено для металлотионеинов, экспрессия которых регулируется транскрипционным фактором MRF-1 (metal-responsive transcription factor 1), взаимодействующим с MRE (metal-responsive elements) в промоторах генов [30]. Также регуляция может осуществляться с участием элементов антиоксидантного ответа (ARE, antioxidant response elements), которые, как известно, активируются в ответ на воздействие различными химическими веществами, металлами, перекисью водорода и модулируют индуцируемую окислительным стрессом транскрипцию многих генов, включая глутатион-S-трансферазу и некоторые металлотионеины [26, 30]. Ещё одним механизмом, который может быть задействован в медь-зависимой регуляции экспрессии генов, является митоген-активируемая протеинкиназная (MAPK, mitogen-activated protein kinase) сигнальная система, обуславливающая активность многих генов, зависимых от внешних стимулов. Так, для клеток бронхиального эпителия человека линии BEAS 2B было описано фосфорилирование с последующей активацией JNK, p38 и ERK под действием ионов металлов, в том числе меди [31]. В случае глутатионсинтеза регуляция экспрессии фермента также может зависеть от истощения пула глутатиона в результате его непосредственного взаимодействия с ионами меди или участия в инактивации активных форм кислорода, образующихся в присутствии  $\text{Cu}^{2+}$  в гепатоцитах, и осуществляться с участием молекул-посредников.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных данных можно сделать выводы о том, что ионы меди в нетоксичной концентрации способны влиять на ключевые показатели жизнеспособности клеток в культуре, регулируя количество цитохром-S-оксидазы и глутатионсинтеза, и, соответственно, могут вызывать изменения в интенсивности энергетического обмена и способности клеток противостоять окислительному стрессу. Данные свойства могут быть применены в работах по регенеративной медицине для тонкой регуляции функциональной и метаболической активности гепато-

цитов в условиях *in vitro*, а также для повышения выживаемости клеток при воздействии стрессовых факторов.

## Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Rahimzadeh MR, Kazemi S, Moghadamnia AA. Copper poisoning with emphasis on its clinical manifestations and treatment of intoxication. *Adv Public Health*. 2024; 6001014. doi: 10.1155/2024/60010142
2. Xue Q, Kang R, Klionsky DJ, Tang D, Liu J, Chen X. Copper metabolism in cell death and autophagy. *Autophagy*. 2023; 19(8): 2175-2195. doi: 10.1080/15548627.2023.2200554
3. Sailer J, Nagel J, Akdogan B, Jauch AT, Engler J, Knolle PA, et al. Deadly excess copper. *Redox Biol*. 2024; 75: 103256. doi: 10.1016/j.redox.2024.103256
4. Wungjiranirun M, Sharzehi K. Wilson's disease. *Semin Neurol*. 2023; 43(4): 626-633. doi: 10.1055/s-0043-1771465
5. Saporito-Magriñá CM, Musacco-Sebio RN, Andrieux G, Kook L, Orrego MT, Tuttolomondo MV, et al. Copper-induced cell death and the protective role of glutathione: The implication of impaired protein folding rather than oxidative stress. *Metallomics*. 2018; 10(12): 1743-1754. doi: 10.1039/c8mt00182k
6. Ruiz LM, Libedinsky A, Elorza AA. Role of copper on mitochondrial function and metabolism. *Front Mol Biosci*. 2021; 8: 711227. doi: 10.3389/fmolb.2021.711227
7. Oe S, Miyagawa K, Honma Y, Harada M. Copper induces hepatocyte injury due to the endoplasmic reticulum stress in cultured cells and patients with Wilson disease. *Exp Cell Res*. 2016; 347(1): 192-200. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.08.003
8. Husain N, Mahmood R. Copper (II) generates ROS and RNS, impairs antioxidant system and damages membrane and DNA in human blood cells. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2019; 26(20): 20654-20668. doi: 10.1007/s11356-019-05345-1
9. Yang F, Pei R, Zhang Z, Liao J, Yu W, Qiao N, et al. Copper induces oxidative stress and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in chicken hepatocytes. *Toxicol In Vitro*. 2019; 54: 310-316. doi: 10.1016/j.tiv.2018.10.017
10. Kang Z, Qiao N, Liu G, Chen H, Tang Z, Li Y. Copper-induced apoptosis and autophagy through oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction in male germ cells. *Toxicol In Vitro*. 2019; 61: 104639. doi: 10.1016/j.tiv.2019.104639
11. Wang X, Cao H, Fang Y, Bai H, Chen J, Xing C, et al. Activation of endoplasmic reticulum-mitochondria coupling drives copper-induced autophagy in duck renal tubular epithelial cells. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2022; 235: 113438. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113438
12. Yang F, Liao J, Yu W, Qiao N, Guo J, Han Q, et al. Exposure to copper induces mitochondria-mediated apoptosis by inhibiting mitophagy and the PINK1/parkin pathway in chicken (*Gallus gallus*) livers. *J Hazard Mater*. 2021; 408: 124888. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124888
13. Zhang C, Huang T, Li L. Targeting cuproptosis for cancer therapy: Mechanistic insights and clinical perspectives. *J Hematol Oncol*. 2024; 17(1): 68. doi: 10.1186/s13045-024-01589-8

14. Kong R, Sun G. Targeting copper metabolism: A promising strategy for cancer treatment. *Front Pharmacol.* 2023; 14: 1203447. doi: 10.3389/fphar.2023.1203447
15. Dremina NN, Trukhan IS, Say OV, Shurygina IA. Activity of hepatic enzymes of isolated hepatocytes under the influence of copper acetate. *International Journal of Biomedicine.* 2022; 12(1): 58-62. doi: 10.21103/Article12(1)\_OA8
16. Shurygina IA, Trukhan IS, Dremina NN, Say OV, Shurygin MG, Prozorova GF, et al. Evaluation of the safety and toxicity of the original copper nanocomposite based on poly-N-vinylimidazole. *Nanomaterials (Basel).* 2021; 12(1): 16. doi: 10.3390/nano12010016
17. Chicherin IV, Dashinimaev E, Baleva M, Krashennikov I, Levitskii S, Kamenski P. Cytochrome C oxidase on the crossroads of transcriptional regulation and bioenergetics. *Front Physiol.* 2019; 10: 644. doi: 10.3389/fphys.2019.00644
18. Timón-Gómez A, Nývltová E, Abriata LA, Vila AJ, Hosler J, Barrientos A. Mitochondrial cytochrome C oxidase biogenesis: Recent developments. *Semin Cell Dev Biol.* 2018; 76: 163-178. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.08.055
19. Chen TH, Wang HC, Chang CJ, Lee SY. Mitochondrial glutathione in cellular redox homeostasis and disease manifestation. *Int J Mol Sci.* 2024; 25(2): 1314. doi: 10.3390/ijms25021314
20. Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(1-2): 42-59. doi: 10.1016/j.mam.2008.05.005
21. Egbujor MC, Olaniyan OT, Emeruwa CN, Saha S, Saso L, Tucci P. An insight into role of amino acids as antioxidants via NRF2 activation. *Amino Acids.* 2024; 56(1): 23. doi: 10.1007/s00726-024-03384-8
22. Zeng H, Saari JT, Johnson WT. Copper deficiency decreases complex IV but not complex I, II, III, or V in the mitochondrial respiratory chain in rat heart. *J Nutr.* 2007; 137(1): 14-18. doi: 10.1093/jn/137.1.14
23. Johnson WT, Brown-Borg HM. Cardiac cytochrome C oxidase deficiency occurs during late postnatal development in progeny of copper-deficient rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2006; 231(2): 172-180. doi: 10.1177/153537020623100207
24. Ruiz LM, Jensen EL, Rossel Y, Puas GI, Gonzalez-Ibanez AM, Bustos RI, et al. Non-cytotoxic copper overload boosts mitochondrial energy metabolism to modulate cell proliferation and differentiation in the human erythroleukemic cell line K562. *Mitochondrion.* 2016; 29: 18-30. doi: 10.1016/j.mito.2016.04.005
25. Dhar SS, Johar K, Wong-Riley MT. Bigenomic transcriptional regulation of all thirteen cytochrome C oxidase subunit genes by specificity protein 1. *Open Biol.* 2013; 3(3): 120176. doi: 10.1098/rsob.120176
26. Song MO, Mattie MD, Lee CH, Freedman JH. The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of copper-responsive transcription. *Exp Cell Res.* 2014; 322(1): 39-50. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.01.013
27. Bouda E, Stapon A, Garcia-Diaz M. Mechanisms of mammalian mitochondrial transcription. *Protein Sci.* 2019; 28(9): 1594-1605. doi: 10.1002/pro.3688
28. Xia JL, Wu S, Zhang RY, Zhang CG, He H, Jiang HC, et al. Effects of copper exposure on expression of glutathione-related genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr Microbiol.* 2011; 62(5): 1460-1466. doi: 10.1007/s00284-011-9881-9
29. Tillquist NM, Thorndyke MP, Thomas TA, Coleman SJ, Engle TE. Impact of cell culture and copper dose on gene expression in bovine liver. *Biol Trace Elem Res.* 2022; 200(5): 2113-2121. doi: 10.1007/s12011-021-02829-5
30. Mattie MD, Freedman JH. Copper-inducible transcription: Regulation by metal- and oxidative stress-responsive pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 286(2): C293-C301. doi: 10.1152/ajpcell.00293.2003
31. Samet JM, Graves LM, Quay J, Dailey LA, Devlin RB, Ghio AJ, et al. Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1998; 275(3): L551-L558. doi: 10.1152/ajplung.1998.275.3.L551

#### Сведения об авторах

**Трухан Ирина Сергеевна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий и регенеративной медицины, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: prede14@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0270-404X>

**Дремина Наталья Николаевна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных технологий и регенеративной медицины, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: drema76@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2540-4525>

**Шурыгина Ирина Александровна** – доктор медицинских наук, профессор РАН, заместитель директора по научной работе, ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», e-mail: irinashurygina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3980-050X>

#### Information about the authors

**Irina S. Trukhan** – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Cell Technologies and Regenerative Medicine, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, e-mail: prede14@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0270-404X>

**Natalya N. Dremina** – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Laboratory of Cell Technologies and Regenerative Medicine, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, e-mail: drema76@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2540-4525>

**Irina A. Shurygina** – Dr. Sc. (Med.), Professor of the RAS, Deputy Director for Science, Irkutsk Scientific Centre of Surgery and Traumatology, e-mail: irinashurygina@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3980-050X>