

УДК 576.6; 576.33

Е. В. ЖОРНИК, Л. А. БАРАНОВА, А. В. ЗАЙЦЕВА, И. Д. ВОЛОТОВСКИЙ

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА НА ИНДУКЦИЮ АПОПТОЗА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: aliana404@gmail.com

(Поступила в редакцию 18.03.2015)

Введение. В настоящее время в технологических процессах наряду с микрочастицами широко применяются наночастицы – материалы и вещества размерами меньше 1 мкм. При таких размерах частиц физико-химические свойства материалов существенно изменяются и даже приобретают абсолютно новые уникальные качества в плане механических, электрических, температурных, магнитных, оптических и иных свойств. Иными словами, наночастицы и наноматериалы по комплексу физических, химических и биологических свойств кардинально отличаются от веществ, характеризующихся макро- и микроразмерами.

Биологическая безопасность наноматериалов и нанотехнологий является важнейшим фактором, регламентирующим их промышленное производство и применение в медицине. Однако до сих пор нет всесторонней оценки биологических рисков применения наночастиц на практике. За рубежом проблема биологической безопасности наноматериалов в настоящее время выдвигается на первый план. Такие исследования проводятся в США, странах Евросоюза, поддерживаются многими международными организациями [1].

Наночастицы диоксида титана в настоящее время являются одними из наиболее распространенных наноматериалов, широко используемых в различных областях. Они применяются при производстве бумаги, красок, керамики, пищевых продуктов, в качестве покрытия сварочных электродов, в фармацевтике и т. д.

В микроразмерном состоянии диоксид титана считается биологически инертным. Однако степень его биологической инертности в наноразмерном состоянии мало изучена. По-видимому, физико-химические характеристики частиц определяют их способность преодолевать различные барьеры в организме и, соответственно, распределяться, накапливаться в органах и тканях и выводиться из организма. Согласно результатам многочисленных исследований, последствия воздействия наночастиц TiO_2 неоднозначны: продемонстрированы цитотоксичность этих наночастиц в отношении различных клеток организма человека и млекопитающих, их общая токсичность для организма в целом или отдельных систем, очень незначительная токсичность или ее отсутствие [2].

Так, было показано, что экспозиция наночастицами диоксида титана в концентрациях от 5 до 40 мкг/мл приводила к повышению образования активных форм кислорода, индукции экспрессии генов, связанных с оксидативным стрессом и воспалением, и даже к гибели клеток бронхиального эпителия человека BEAS-2B [3]. В этой же работе было показано, что наночастицы диоксида титана проникали в клетку и распределялись в цитоплазме в перинуклеарной зоне. Исследование цитотоксичности наночастиц диоксида титана (3–600 мкг/мл) на клетках фибробластов мышей L929 выявило изменение формы клеток, фрагментацию хроматина и некроз клетки, а также повышенное образование активных форм кислорода [4].

В присутствии наночастиц диоксида титана в среде RPMI, в которой культивировались человеческие монобластные клетки, через 24 и 48 ч обнаруживались некротические измененные клетки, а кроме того, запускался процесс апоптоза [5]. В клетках альвеолярного эпителия человека A549 наночастицы диоксида титана провоцировали более выраженные воспалительные реакции, чем его более крупные частицы [6]. Однако имеется и ряд других работ, авторы которых не выявили токсичности наночастиц диоксида титана [7, 8].

Реакция живых организмов на действие наночастиц осуществляется с участием иммунной системы. Популяция лимфоцитов периферической крови человека, являясь одним из основных компонентов иммунной системы, участвует практически во всех этапах формирования иммунного ответа. В этой связи особый интерес представляет изучение взаимодействия наночастиц диоксида титана с клетками лимфоцитов человека, а также последствий этого взаимодействия.

Необходимость целенаправленного и всестороннего изучения потенциальных эффектов наночастиц на клеточном, субклеточном и молекулярных уровнях, в том числе и наночастиц TiO₂, определила цель работы – изучение взаимодействия наночастиц диоксида титана с клетками лимфоцитов человека и структурно-функциональных последствий этого взаимодействия для оценки биосовместимости наноматериала.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследования использовались лимфоциты периферической крови доноров и наночастицы диоксида титана размером ~ 21 нм.

Выделение лимфоцитов проводили согласно стандартной методике выделения мононуклеаров периферической крови в градиенте плотности фиколл-урографина [9].

Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием теста поглощения ими нейтрального красного [10], что позволяет идентифицировать в культуре жизнеспособные, поврежденные или мертвые клетки и является высокочувствительным, интегрированным критерием определения целостности клеток. Для этого выделенные лимфоциты обрабатывали наночастицами диоксида титана, помещали на время инкубации (24–48 ч) в CO₂-инкубатор при 37 °С. Затем лимфоциты отмывали от наночастиц трис-солевым буфером (TBS) (0,14 M NaCl, 5 mM KCl, 25 mM Трис-HCl, pH 7,4), аккуратно удаляли промывочный раствор. Добавляли 1 мл 50 мкг/мл нейтрального красного (NR) (3-амино-7-диметиламино-2-метилфеназин гидрохлорид) в среде без сыворотки и инкубировали пробы в течение 3 ч. После инкубации удаляли среду, содержащую NR, и промывали клетки TBS буфером. Добавляли 500 мкл десорбирующего свежеприготовленного NR раствора (49 частей дистиллированной воды + 50 частей 96 %-ного этанола + 1 часть ледяной уксусной кислоты). Аккуратно встряхивали пробирки в течение 30 мин до тех пор, пока NR не экстрагируется из клеток и не образует гомогенный раствор. Оптическую плотность экстракта NR измеряли на спектрофотометре при 540 нм.

Нейтральный красный является слабым катионным красителем, который легко преодолевает мембранные барьеры путем неионной диффузии, а также быстро проникает в лизосомы клеток. Изменение состояния поверхности клеток или целостность лизосомальных мембран сопровождается увеличением ломкости лизосом, другими необратимыми внутриклеточными изменениями. Такие изменения сопровождаются уменьшением оптического поглощения при 540 нм и связыванием нейтрального красного внутриклеточными структурами.

Определение активных форм кислорода проводили с использованием флуоресцентных красителей дихлорфлуоресцеина диацетата (DCFH-DA) и дигидроэтидиума (DHE). Выделенные лимфоциты помещали в питательную среду RPMI-1640 (ThermoScientific, Литва). Суспензию инкубировали 60 мин при 37 °С в присутствии 25 мкМ DCFH-DA либо 10 мкМ DHE. Избыток красителя удаляли путем центрифугирования (10 мин, 600 g), осадок растворяли в 1 мл TBS-буфера. Затем 200 мкл нагруженных лимфоцитов помещали в кювету, содержащую 1,8 мл TBS-буфера, и через 60 с добавляли наночастицы диоксида титана. Интенсивность флуоресценции каждого из зондов измеряли на спектрофлуориметре CM 220 SOLAR (Technical Service, Беларусь) при $\lambda_{\text{возб/исп}} = 488/525$ нм.

Для выделения геномной ДНК клетки лимфоцитов промывали TBS-буфером, а затем выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification (ThermoScientific, Литва). Проводили вертикальный электрофорез в 1 %-ном агарозном геле. Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали.

Результаты и их обсуждение. Оценку жизнеспособности лимфоцитов при действии на них TiO_2 проводили с помощью теста на «захват» клетками нейтрального красного. При изучении влияния наночастиц диоксида титана было показано статистически достоверное снижение жизнеспособности клеток уже после 24-часовой обработки наночастицами в концентрации 25–100 мкг/мл. Доля живых лимфоцитов в культуре уменьшилась до 78–86 %.

При увеличении продолжительности воздействия наночастиц диоксида титана на лимфоциты человека было отмечено еще более существенное уменьшение выживаемости клеток – через 48 ч инкубации снижение количества жизнеспособных клеток было отмечено уже во всех пробах (5–100 мкг/мл) (рис. 1).

Полученные результаты указывают на наличие цитотоксического эффекта наночастиц диоксида титана, при этом степень цитотоксичности зависит от концентрации и времени воздействия наночастиц на клетки. Аналогичные данные были получены в работе [11] на клетках линии НЕК-293.

Одним из возможных пусковых моментов действия наночастиц искусственного происхождения на клетки является генерация в них активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса. В литературе это явление описано для различных типов клеток [2, 12]. Для подтверждения данного положения в отношении лимфоцитов были проведены эксперименты по изучению образования АФК под действием различных концентраций наночастиц TiO_2 .

При воздействии наночастиц в концентрации 10–100 мкг/мл уровень содержания супероксид анион радикала в клетках оценивали с использованием флуоресцентного красителя дигидроэтидиум (DHE), тотальный уровень активных форм кислорода – с помощью флуоресцентного зонда дихлорфлуоресцеин-диацетата (DCFH-DA) (рис. 2).

В опытах с обоими зондами было показано, что интенсивность флуоресценции значительно возрастает во времени после воздействия наночастиц диоксида титана, что свидетельствует об образовании АФК и их накоплении в клетках. Рост интенсивности флуоресценции при этом носил дозозависимый характер.

Таким образом, выявленное в ходе экспериментов увеличение интенсивности флуоресценции обоих зондов свидетельствует о способности данного типа наночастиц индуцировать образование АФК.

Известно, что окислительный стресс может вызывать окислительную модификацию нуклеотидов и нуклеиновых кислот, особенно ДНК, оказывая тем самым генотоксическое действие [13]. Реализация генотоксического эффекта осуществляется в несколько этапов и при участии сложной цепи различных сигнальных путей. АФК, приводящие к разрывам и нарушению структуры ДНК, в конечном итоге вызывают апоптоз. Апоптоз является не только физиологическим процессом, позволяющим удалить утратившие свои функции старые клетки, но и сопряжен с различными патологическими состояниями. Он может быть вызван действием внутриклеточных и внешних факторов. Молекулярные сценарии апоптоза запускаются в цитозоле или мембранных органеллах клетки, но реализуются исключительно в ядре через генетический аппарат в ходе необратимой межнуклеосомной фрагментации ДНК. Расщепление ДНК катализирует $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -зависимая эндонуклеаза, которая работает на линкерных участках макромолекулы, поэтому хроматин не подвергается полному лизису, а лишь фрагментируется [14]. Распад ДНК происходит не одновременно, а включает несколько последовательных этапов разделения молекулы по уровням сложности ее структурной организации. Сначала формируются крупные фрагменты

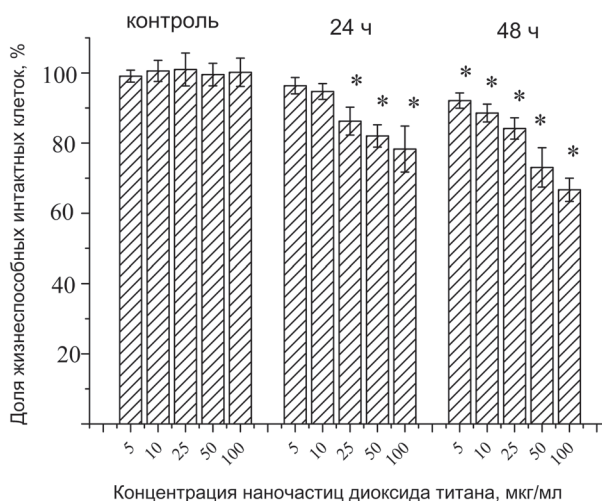


Рис. 1. Цитотоксическое действие наночастиц диоксида титана в отношении лимфоцитов в зависимости от концентрации и времени воздействия TiO_2 . Данные представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение ($n = 4$)

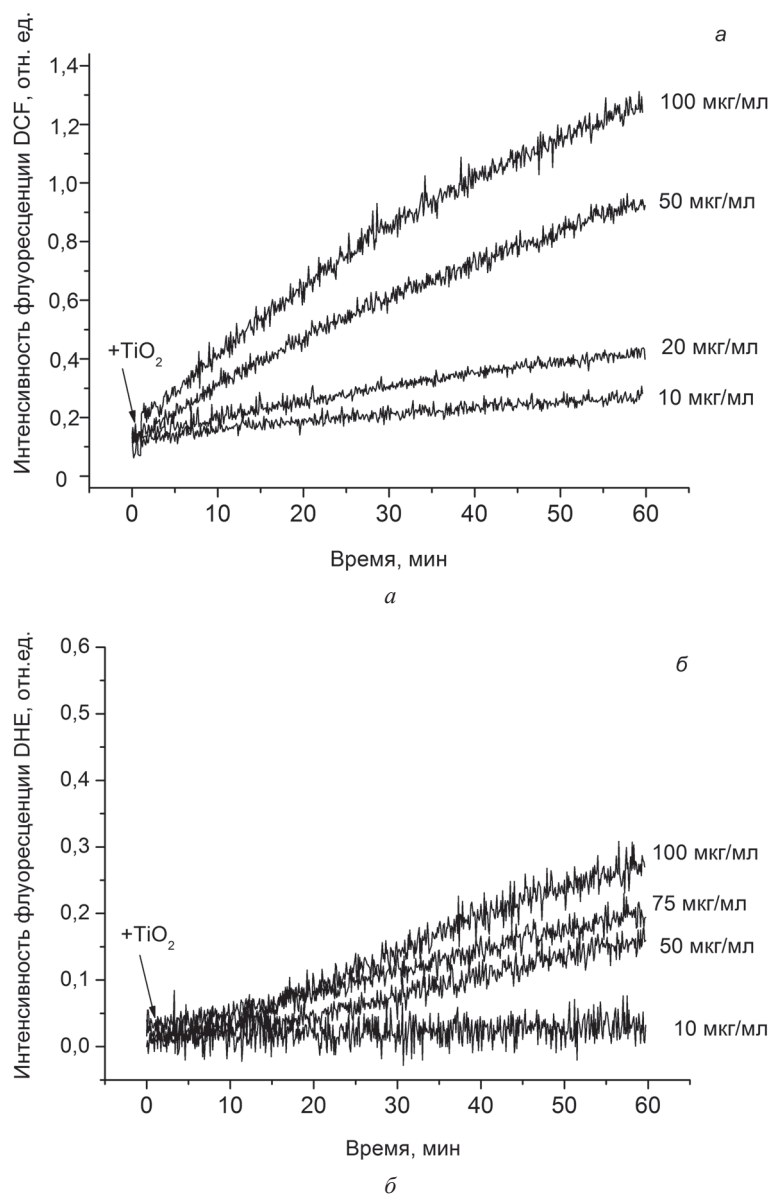


Рис. 2. Влияние различных концентраций наночастиц диоксида титана на интенсивность флуоресценции зондов DCFH-DA (а) и DHE (б) в лимфоцитах

ДНК, содержащие 250–300 тыс. п. н. Микроскопически этот этап определяется как конденсация хроматина с образованием выпячиваний ядерной мембраны. Затем формируются фрагменты из 30–50 тыс. п. н. На последнем этапе происходит расщепление ДНК в участках сцепления нуклеосом и образование окончательных фрагментов из 180–190 п. н. [15]. Именно эти фрагменты выявляются в виде «лесенки» при электрофорезе ДНК (лизаты апоптотических клеток), который широко используется для идентификации апоптоза. На выявлении фрагментации ДНК основаны морфологические тесты на апоптоз.

Процесс определения апоптоза в культуре клеток включает выделение геномной ДНК и последующий ее электрофорез. В связи с этим нами были проведены эксперименты по влиянию искусственных наночастиц TiO_2 на индукцию апоптоза в клетках лимфоцитов. Использовались концентрации наночастиц 50 и 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Время инкубации культуры клеток лимфоцитов с наночастицами TiO_2 составляло 24–48 ч.

В ходе работы были получены данные, свидетельствующие о способности наночастиц TiO_2 в концентрации 50–100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ индуцировать повреждение ДНК. Показано, что ДНК, выделенная из контрольных образцов, мигрировала в виде цельной высокомолекулярной полосы с длиной

фрагмента более 10 000 п. н. В противоположность этому, в образцах ДНК, выделенных после обработки наночастицами, наблюдалась дозозависимая фрагментация (рис. 3).

Наличие на электрофореграмме картины, характерной для фрагментации ДНК, свидетельствует о том, что при действии определенных концентраций наночастиц TiO_2 на лимфоциты человека происходит индукция необратимых двухцепочечных разрывов. Аналогичные данные были получены Dunford и соавт. [16] в отношении наночастиц TiO_2 размером 20–50 нм.

В литературе представлено множество данных о токсическом действии наночастиц различной природы. Среди возможных причин токсичности рассматривают избыточную генерацию АФК и последующее развитие окислительного стресса как наиболее вероятные причины развивающихся негативных последствий. Отмеченное в данной работе цитотоксическое действие наночастиц диоксида титана в отношении лимфоцитов человека также можно объяснить развитием в клетке окислительного стресса. Образующиеся в клетке под влиянием наночастиц АФК через окислительный стресс изменяют проницаемость мембраны митохондрий, вызывают повреждение дыхательной цепи, запускают процесс апоптоза.

Большинство форм апоптоза у позвоночных реализуется по митохондриальному пути. Митохондриальный сигнальный путь апоптоза реализуется в результате выхода апоптогенных белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки. Предполагается, что высвобождение апоптогенных белков может осуществляться двумя путями: за счет разрыва митохондриальной мембраны или же путем открытия высокопроницаемых каналов на внешней мембране митохондрий.

Ключевым событием митохондриального пути апоптоза является повышение проницаемости наружной мембраны митохондрий. Существенную роль в повышении проницаемости играют апоптотические Bcl-2 белки – Bax и Bak. Они встраиваются в наружную мембрану митохондрий и олигомеризуются. При этом, вероятно, нарушается целостность внешней мембраны митохондрий. При повышении проницаемости наружной мембраны митохондрий из их межмембранного пространства в цитозоль высвобождаются растворимые белки, участвующие в апоптозе: цитохром *c*; прокаспазы-2, -3 и -9; фактор индуцирующий апоптоз AIF [17, 18].

Разрыв внешней мембраны митохондрий объясняется увеличением объема митохондриального матрикса. Данный процесс связывают с раскрытием пор митохондриальной мембраны, приводящим к снижению мембранного потенциала и высокоамплитудному набуханию митохондрий вследствие осмотического дисбаланса. Разнообразны факторы, вызывающие раскрытие пор. К ним относятся истощение клеток восстановленным глутатионом, NAD(P)H, АТФ и АДФ, образование активных форм кислорода, разобщение окислительного фосфорилирования протонифорными соединениями, увеличение содержания Ca^{2+} в цитоплазме. Образование пор в митохондриях может быть вызвано церамидом, NO, каспазами, амфипатическими пептидами, жирными кислотами [19].

Цитохром *c* в цитоплазме клетки участвует в формировании апоптосомы вместе с белком АРАФ-1 [20]. Олигомеризация 7 субъединиц трансформированного белка АРАФ-1 происходит с участием цитохрома *c* и прокаспазы-9. Так образуется апоптосома, активирующая каспазу-9. Зрелая каспаза-9 связывает и активирует прокаспазу-3 с образованием эффекторной каспазы-3. Высвобождающийся из межмембранного пространства митохондрий флавопротеин AIF является эффектором апоптоза, действующим независимо от каспаз.

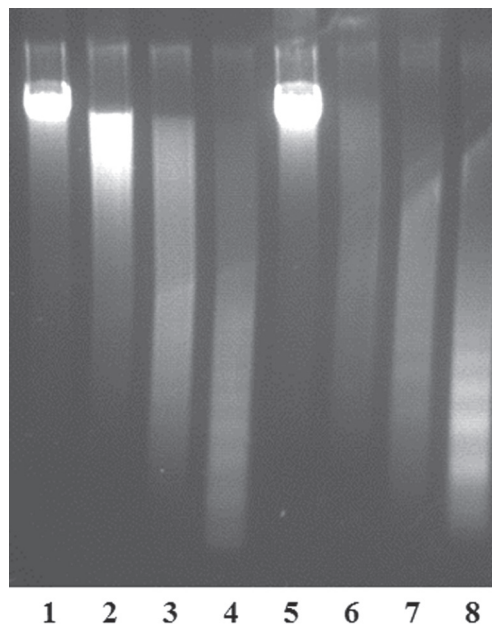


Рис. 3. Фрагментация лимфоцитарной ДНК под действием наночастиц диоксида титана: через 24 ч (1 – контроль) и в течение 24 ч (2, 3, 4 – инкубация 25, 50 и 100 мкг/мл соответственно), через 48 ч (5 – контроль) и в течение 48 ч (6, 7, 8 – 25, 50 и 100 мкг/мл соответственно)

Следует отметить, что реализация апоптоза может происходить в результате комбинированного действия двух основных сигнальных путей – рецептор-зависимого и митохондриального. Помимо этого, существует и ряд менее распространенных механизмов инициации апоптоза [21].

Заключение. В результате проведенных исследований было изучено влияние различных концентраций наночастиц диоксида титана на жизнеспособность лимфоцитов человека, индукцию образования АФК в культуре клеток и целостность структуры ДНК.

Методом окраски клеток витальным красителем нейтральным красным показано значимое снижение количества жизнеспособных лимфоцитов человека в культуре под воздействием наночастиц диоксида титана, при этом их количество зависело от времени воздействия и концентрации наночастиц. Оценивая результаты проведенных исследований, можно предположить, что гибель клеток могла быть результатом апоптоза, о чем свидетельствовали данные по фрагментации ДНК, а запуск процессов апоптоза был инициирован в клетке окислительным стрессом, развитие которого зафиксировано с помощью флуоресцентных зондов.

Литература

1. Wang B. // *Toxicol. Lett.* 2006. Vol. 161, N 2. P. 115–123.
2. Shi H., Magaye R., Castranova V. et al. // *Particle and Fibre Toxicol.* 2013. Vol. 10. P. 15–48.
3. Park E. J., Yi J., Chung K. H. et al. // *Toxicol. Lett.* 2008. Vol. 180, N 3. P. 222–229.
4. Jin C. Y., Zhu B. S., Wang X. F. et al. // *Chem. Res. Toxicol.* 2008. Vol. 21, N 9. P. 1871–1877.
5. Vamanu C. I., Cimpan M. R., Hol P. J. et al. // *Toxicol. in Vitro.* 2008. Vol. 22, N 7. P. 1689–1696.
6. Monteiller C., Tran L., MacNee W. et al. // *Occup. Environ. Med.* 2007. Vol. 64, N 9. P. 609–615.
7. Woodruff R. S., Li Y., Yan J. et al. // *J. Appl. Toxicol.* 2012. Vol. 32, N 11. P. 934–943.
8. Wan R., Mo Y., Feng L. et al. // *Chem. Res. Toxicol.* 2012. Vol. 25, N 7. P. 1402–1411.
9. Beckman K. B., Ames A. M. // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 19633–19636.
10. Савченко Д. С. // *Вестн. нов. мед. технологий.* 2013. Т. 20, № 4. С. 44–47.
11. Meena R., Pal R., Pradhan S. N. et al. // *Adv. Mat. Lett.* 2012. Vol. 3, N 6. P. 459–465.
12. Aueviriyavit S., Phummiratch D., Kulthong K. et al. // *Biol. Trace Elem. Res.* 2012. Vol. 149, N 1. P. 123–132.
13. Кулинский В. И. // *Сорос. образов. журн.* 1999. № 1. С. 2–7.
14. Chae I. H., Park K. W., Kim H. S. et al. // *Clin. Chim. Acta.* 2004. Vol. 341, N 1–2. P. 83–91.
15. Oppenheim R. W. // *Fundamental Neurosci.* 1999. P. 581–609.
16. Dunford R., Salinaro A., Cai L. et al. // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 418. P. 87–90.
17. Skulachev V. P. // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 423, N 3. P. 275–280.
18. Yang J., Liu X., Bhalla K. et al. // *Science.* 1997. Vol. 275, N 5303. P. 1129–1132.
19. Kroemer G., Zamzami N., Susin S. A. // *Immunol. Today.* 1997. Vol. 18. P. 44–51.
20. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I. et al. // *Cell.* 1997. Vol. 91. P. 479–489.
21. Banfalvi G. *Apoptotic Chromatin Changes.* Heidelberg; London; New York: Springer Science+Business Media B. V., Springer Dordrecht, 2009. P. 125–202.

E. V. ZHORNIK, L. A. BARANOVA, A. V. ZAITSEVA, I. D. VOLOTOVSKI

TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES INDUCE APOPTOSIS IN HUMAN LYMPHOCYTES

Summary

To assess the risks of artificial nanostructures the influence of titanium dioxide nanoparticles on viability of lymphocytes, generation of reactive oxygen species, as well as the potential genotoxic effects of TiO₂ were studied. The experimental data demonstrate the ability of TiO₂ nanoparticles lead to cell death, induce oxidative stress and reactive oxygen species formation, causing dose-dependent generation of ROS, but also induce DNA damage in a concentration of 50–100 µg/ml. ROS and subsequent oxidative stress are the most likely causes of the negative consequences and ultimately the cell death by apoptosis.