

О. П. ЯВОРОВСЬКИЙ¹, Д. О. МІНЧЕНКО^{1,2}, Н. В. СОЛОХА¹,
А. М. ШИШ³, О. Г. МІНЧЕНКО² (Київ)

ГЕНОТОКСИЧНА ТА ЦИТОТОКСИЧНА ДІЯ НАНОЧАСТИНОК НІТРИДУ ТИТАНУ І ДИСИЛІЦИДУ ХРОМУ ЯК КРИТЕРІЇ ОЦІНКИ ВПЛИВУ НА ОРГАНІЗМ

¹Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України;

³Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця <s.nina1990@ukr.net>

У печінці мишей досліджено вплив наночастинок дисиліциду хрому та нітриду титану на рівень експресії гена FABP4 (fatty acid binding protein 4), який відображає стан стресу клітин, зокрема стресу ендоплазматичного ретикулуму. Встановлено, що під час дії на мишей наночастинок нітриду титану та дисиліциду хрому (20 мг з їжею кожного робочого дня протягом 2 міс) експресія гена FABP4 значно посилюється у печінці мишей, але ефект наночастинок дисиліциду хрому був більш вираженим. Виявлено також знижений рівень продукування вільних радикалів у печінці мишей, що свідчить про виснаження ресурсів антиоксидантної системи. Зокрема, відмічено зниження активності каталази в 2 рази під час дії як наночастинок дисиліциду хрому, так і нітриду титану. Результати дослідження показали, що наночастинок дисиліциду хрому та нітриду титану порушують експресію гена FABP4 у печінці мишей, що відображає генотоксичну дію обох типів наночастинок, однак молекулярні механізми їх впливу на геном потребують подальшого вивчення.

Ключові слова: експресія мРНК, FABP4, наночастинок дисиліциду хрому, наночастинок нітриду титану, печінка мишей, каталаза.

Вступ. Швидкий розвиток нанотехнологій зумовив використання техногенних наноматеріалів, у тому числі нітриду титану та дисиліциду хрому, в конкретних галузях техніки і біомедицини, зокрема для лікування, діагностики, моніторингу та контролю біологічних систем на молекулярному рівні [11, 13]. Проте тривала дія наночастинок діоксиду титану на організм призводить до їх накопичення в мозку, надмірної проліферації всіх гліальних клітин, окислювального стресу і некрозу тканин, а також апоптозу клітин та істотних змін в експресії генів [15]. Більше того, введення пер ос мишам наночастинок діоксиду титану порушує метаболічні функції печінки [14]. Недавно було встановлено, що біологічні ефекти наночастинок діоксиду титану, в тому числі й токсичність, залежать від їх розміру і геометрії, але всі досліджені варіанти цих наночастинок порушують внутрішньоклітинний гомеостаз кальцію, а це призводить до стресу ендоплазматичного ретикулуму [12].

Разом з тим недостатньо відомостей про токсичність, включаючи генотоксичність, індуковану наночастинками нітриду титану, і їх вплив на печінку. Є дані [2], що наночастинок оксиду хрому мають значну цитотоксичну дію на клітини саркоми мишей, але токсичність наночастинок дисиліциду хрому не досліджено. Разом з тим є дані [7, 10], що довготривалий вплив хрому призводить до розвитку злоякісних пухлин і кверцетин пригнічує цей процес.

Раніше було показано, що фулерени C₆₀ і одностінні карбонові нанотрубки впливають на експресію деяких стресчутливих генів, пов'язаних з процесами проліферації клітин, їх виживання та смерті [8, 9]. Виявлено зв'язок між стресом ендоплазматичного ретикулуму, який контролює численні процеси, включаючи проліферацію і виживання клітин, та різними захворюваннями, зокрема злоякіс-

ними пухлинами і метаболічними захворюваннями [4, 5, 10]. Протеїн FABP4 (fatty acid binding protein 4, adipocyte) зв'язується з ретиноевою кислотою і структурними компонентами жирних кислот, є ланцюжком між метаболічними порушеннями при ожирінні і розвитком резистентності до інсуліну, індукує стрес ендоплазматичного ретикулуму та пов'язаний з канцерогенезом [3]. Можливо, тривалий вплив на мишей наночастинок дисиліциду хрому і нітриду титану також призводить до стресу ендоплазматичного ретикулуму і змінює експресію стрес-залежних генів, інтегрованих у сигнальні шляхи відповіді на незгорнуті протеїни, і які регулюють проліферацію клітин та апоптоз.

Відомо також, що одним з факторів, які визначають розвиток патологічних процесів у разі стресу, є активація вільнорадикальних процесів і підвищення рівня активних форм кисню (АФК) у різних тканинах, у тому числі у печінці, яка відповідає за детоксикацію, при цьому важливу роль в антиоксидантному захисті клітин відіграє каталаза [6].

Мета дослідження – вивчити вплив наночастинок дисиліциду хрому та нітриду титану на рівень експресії гена *FABP4*, який відображає стан стресу клітин, та активність антиоксидантних систем у печінці мишей для оцінки можливих генотоксичних і цитотоксичних ефектів цих наночастинок.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на самцях мишей, які проходили необхідний карантин у віварії і їх утримували в індивідуальних клітках на звичайному харчовому раціоні в умовах вільного доступу до води та їжі. Наночастинки нітриду титану (20 нм) і дисиліциду хрому (45 нм) були синтезовані в Інституті проблем матеріалознавства ім. І. М. Францевича НАН України. Кожна миша щоденно протягом 2 міс отримувала по 20 мг наночастинок (в суспензії, яку наносили на хліб). Тварин виводили з експерименту методом декапітації згідно із «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах».

Тканину печінки (100 мг) гомогенізували в 0,4 мл реагенту Trizol (Invitrogen, США) і загальну РНК екстрагували відповідно до протоколу виробника. Осади РНК промивали 75 % етанолом і розчиняли у воді, вільній від нуклеаз. Для додаткового очищення зразки РНК повторно осаджували за допомогою 95 % етанолу і повторно розчиняли у воді, вільній від нуклеаз. Концентрацію РНК і спектральні характеристики вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop ND1000 (Peqlab, Biotechnologie GmbH).

Синтез кДНК проводили за набором для синтезу кДНК (Thermo Scientific Verso, Литва) відповідно до протоколу виробника. Рівень експресії мРНК FABP4 та мРНК бета-актину в тканині печінки вимірювали за кількісною полімеразною ланцюговою реакцією у реальному часі з використанням "QuantStudio 5 Real-Time PCR System" (Thermo Fisher Scientific, США) і Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США). Полімеразну ланцюгову реакцію проводили 3 рази з використанням специфічної пари праймерів, отриманих із Sigma-Aldrich, США. Для ампліфікації кДНК FABP4 (fatty acid binding protein 4, adipocyte) використовували такі праймери: прямий – 5'-TTTCSTTCAAACSTGGGCGTG-3' та зворотний 5'-CATTCCACCACCAGCTTGTC-3'. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 253–272 і 418–399 в кДНК FABP4 миші (GenBank accession number NM_024406), а розмір ампліфікованого фрагмента становить 166 пар нуклеотидних залишків. Ампліфікацію кДНК бета-актину (ACTB) проводили з використанням прямого – 5'-CCTSTATGCCAACACAGTGC-3 та зворотного – 5'-CCTGCTTGCTGATCCACATC-3 праймерів. Нуклеотидні послідовності цих праймерів відповідають послідовностям 985–1004 і 1190–1171 в кДНК ACTB миші (NM_007393). Розмір ампліфікованого фрагмента становить 206 пар нуклеотидних залишків. Експресію мРНК бета-актину використовували як контроль кількості РНК, взятої для аналізу.

Аналіз кількісної ПЛР проводили з використанням програмного забезпечення «Differential expression calculator». Значення експресії гена *FABP4* були нормалізовані за експресією мРНК бета-актину і представлені як відсоток від конт-

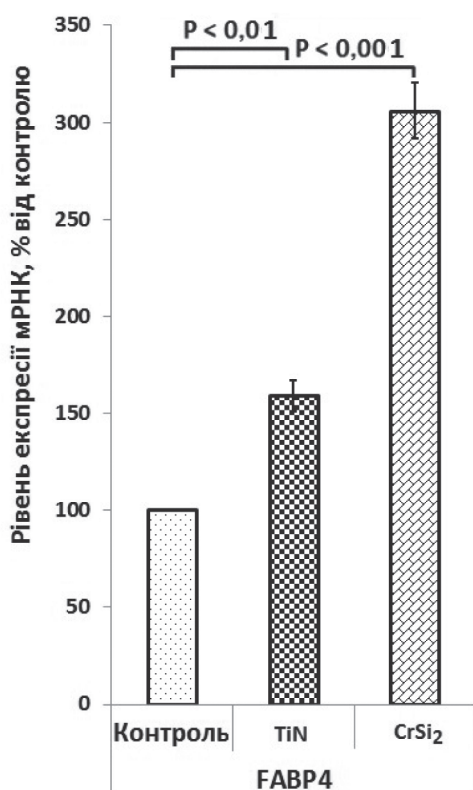


Рис. 1. Вплив тривалої дії (2 міс) наночастинок нітриду титану (TiN) та дисиліциду хрому (CrSi₂) на експресію мРНК FABP4 у печінці мишей за даними кількісної полімеразної реакції у реальному часі. Значення експресії мРНК FABP4 нормалізували за мРНК бета-актину і їх наведено як відсоток від контролю (100 %); n = 4

експресію гена *FABP4* у печінці мишей, що відображає генотоксичну дію цих наночастинок, але для в'яснення молекулярних механізмів їх впливу на функцію чутливого до стресу гена *FABP4* необхідні подальші дослідження.

У печінці мишей у разі дії наночастинок дисиліциду хрому та нітриду титану було виявлено зниження рівня продукування вільних радикалів, що може бути ознакою уповільненого запального процесу і вказувати на токсичну дію цих наночастинок (таблиця).

Індукована (H₂O₂ + Fe²⁺) хемілюмінесценція гомогенату печінки лабораторних мишей при введенні per os нітриду титану та дисиліциду хрому (M ± m, n = 10)

Показник	Контроль	Нано TiN	Нано CrSi ₂
Загальна світлосума хемілюмінесценції за 5 хв, мВ/с	21620,7 ± 1377,5	12267,5 ± 607,9*	14211,5 ± 929,1*
Амплітуда швидкого спалаху, мВ	33,62 ± 2,96	13,00 ± 1,19*	28,00 ± 2,42
Інтенсивність випромінювання через 5 хв, мВ	398,75 ± 48,83	611,14 ± 79,95*	696,12 ± 63,39*

*Достовірно порівняно з контролем (P < 0,05).

Загальна світлосума ХЛ у печінці за 5 хв реєстрації була нижчою на 43 % (P < 0,05) при дії нітриду титану, та на 34 % (P < 0,05) від дії дисиліциду хрому

ролю (100 %). Всі величини виражали як середнє ± m із чотирьох незалежних експериментів.

Сумарну інтенсивність вільнорадикального окислення визначали у гомогенаті печінки мишей методом індукованої хемілюмінесценції (ХЛ) за реакцією Фентона (Fe²⁺ 2 ммоль/л, H₂O₂ 8,8 ммоль/л при рН 7,4) шляхом визначення загальної світлосуми випромінювання за 5 хв (Σ5), амплітуди швидкого спалаху (I_{max}) та інтенсивності випромінювання через 5 хв (I_{min}), що є інтегральним показником стану антиоксидантної системи.

У гомогенаті печінки оцінювали також активність антиоксидантного фермента каталази (КТ) [1]. Статистичну обробку результатів проводили за ліцензійним програмним пакетом Excel (Microsoft Office XP, S/N T24GR-X4YWV-DJJ6Q-92PQ2-4VMG8)

Результати та їх обговорення. Проведеними дослідженнями встановлено, що рівень експресії гена *FABP4* у клітинах печінки підвищувався на 59 % при дії на мишей наночастинок нітриду титану порівняно з контрольними тваринами і що наночастинок дисиліциду хрому виявляють значно сильніший ефект (+206 %) на експресію цього гена (рис. 1).

Отже, в результаті дослідження виявлено виражений вплив наночастинок дисиліциду хрому та нітриду титану на

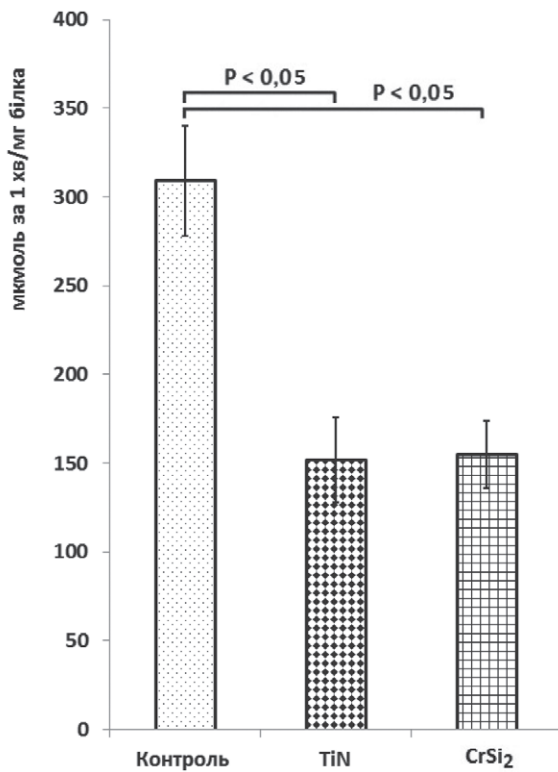


Рис. 2. Активність каталази у печінці мишей

дативного стресу. Відомо, що при оксидативному стресі виникає загроза токсичного ураження організму, викликаного АФК, які можуть призводити до пошкодження ДНК, білкових та ліпідних комплексів у клітині [6].

Висновки. 1. Тривалий вплив наночастинок дисиліциду хрому і нітриду титану (2 міс по 20 мг щоденно, крім вихідних) призводить до підвищення експресії стресозалежного гена *FABP4* у печінці мишей, при цьому дія дисиліциду хрому була більш вираженою. 2. У печінці мишей при дії наночастинок дисиліциду хрому і нітриду титану спостерігається зниження рівня продукування вільних радикалів та активності каталази, що свідчить про розвиток оксидативного стресу і виснаження ресурсів антиоксидантної системи. 3. При науковому обґрунтуванні заходів безпеки праці операторів, зайнятих одержанням наночастинок дисиліциду хрому і нітриду титану, та обґрунтуванні гранично допустимого вмісту цих наночастинок у повітрі робочої зони слід враховувати їх гено- та цитотоксичні властивості.

Список літератури

1. Королюк М. А., Иванова А. И., Майорова И. Т., Токарев В. Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
2. Alarifi S., Ali D., Alkahtani S. Mechanistic investigation of toxicity of chromium oxide nanoparticles in murine fibrosarcoma cells // Int. J. Nanomedicine. – 2016. – № 11. – P. 1253–1259.
3. Bosquet A., Guaita-Esteruelas S., Saavedra P. et al. Exogenous FABP4 induces endoplasmic reticulum stress in HepG2 liver cells // Atherosclerosis. – 2016. – Vol. 249. – P. 191–199.
4. Bravo R., Parra V., Gatica D. et al. Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration // Int. Rev. Cell. Mol. Biol. – 2013. – Vol. 301. – P. 215–290.
5. Chevet E., Hetz C., Samali A. Endoplasmic reticulum stress-activated cell reprogramming in oncogenesis // Cancer Discov. – 2015. – Vol. 6, N 5. – P. 586–597.
6. Chida Y., Sudo N., Kubo C. Does stress exacerbate liver diseases? // J. Gastroenterol. Hepatol. – 2006. – Vol. 21, N 1, Pt 2. – P. 202–208.

порівняно з контролем (див. таблицю). Амплітуда швидкого спалаху (I_{\max}) була також зниженою, а показник інтенсивності випромінювання через 5 хв (I_{\min}) був майже в 2 рази вищим від дії обох типів наночастинок порівняно з контролем. На підставі змін I_{\min} можна міркувати про швидкість затухання ХЛ та опосередковано про стан антиоксидантної системи. Отримане нами зниження показників світіння ХЛ у печінці відображає знижене продукування АФК внаслідок розвитку оксидативного стресу. Можна припустити, що при хронічній дії досліджуваних наночастинок формується дисбаланс між продукуванням АФК та антиоксидантною системою. На рис. 2 зображено зниження у печінці активності каталази в 2 рази при дії як наночастинок дисиліциду хрому, так і нітриду титану порівняно з контролем, що може свідчити про пригнічення антиоксидантних ресурсів печінки, накопичення вільних активних радикалів і розвиток оксидативного стресу.

7. *Humphries B., Wang Z., Yang C.* The role of microRNAs in metal carcinogen-induced cell malignant transformation and tumorigenesis // *Food. Chem. Toxicol.* – 2016. – Vol. 98, Pt A. – P. 58–65.
8. *Minchenko D. O., Prylutska S. V., Moenner M.* et al. Effect of C60 fullerene on the expression of ERN1 signaling related genes in human astrocytes // *Mat-wiss u Werkstofftech.* – 2013. – Vol. 44, N 2–3. – P. 150–155.
9. *Minchenko O. H., Tsybal D. O., Minchenko D. O.* et al. Single-walled carbon nanotubes affect the expression of CCND2 gene in human U87 glioma cells // *Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* – 2016. – Vol. 47, N 2–3. – P. 180–188.
10. *Pratheeshkumar P., Son Y. O., Divya S. P.* et al. Quercetin inhibits Cr(VI)-induced malignant cell transformation by targeting miR-21-PDCD4 signaling pathway // *Oncotarget.* – 2016. – Jun. 17. doi: 10.18632/oncotarget.10130.
11. *Rollerova E., Tulinska J., Liskova A.* et al. Titanium dioxide nanoparticles: some aspects of toxicity/focus on the development // *Endocr. Regul.* – 2015. – Vol. 49, N 2. – P. 97–112.
12. *Simon M., Saez G., Muggioli G.* et al. In situ quantification of diverse titanium dioxide nanoparticles unveils selective endoplasmic reticulum stress-dependent toxicity // *Nanotoxicology.* – 2017. – Jan 3:1-41. doi: 10.1080/17435390.2017.1278803.
13. *Van Hove R. P., Sierevelt I. N., van Royen B. J., Nolte P. A.* Titanium-nitride coating of orthopaedic implants: a review of the literature // *Biomed. Res. Int.* – 2015: 485975.
14. *Yang J., Luo M., Tan Z.* et al. Oral administration of nano-titanium dioxide particle disrupts hepatic metabolic functions in a mouse model // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 49. – P. 112–118.
15. *Ze Y., Hu R., Wang X.* et al. Neurotoxicity and gene-expressed profile in brain-injured mice caused by exposure to titanium dioxide nanoparticles // *J. Biomed. Mater. Res A.* – 2014. – Vol. 102, N 2. – P. 470–478.

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ НИТРИДА ТИТАНА И ДИСИЛИЦИДА ХРОМА КАК КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ НА ОРГАНИЗМ

А. П. Яворовский, Д. О. Минченко, Н. В. Солоха, А. М. Шиш, О. Г. Минченко (Киев)

В печени мышей исследовано влияние наночастиц дисилицида хрома и нитрида титана на уровень экспрессии гена *FABP4* (fatty acid binding protein 4), который отражает состояние стресса клеток, в частности стресса эндоплазматического ретикулума. Установлено, что при воздействии на мышей наночастиц нитрида титана и дисилицида хрома (20 мг с пищей каждый рабочий день в течение 2 мес) экспрессия гена *FABP4* значительно усиливается в печени мышей, но эффект наночастиц дисилицида хрома был более выраженным. Выявлено также снижение уровня продукции свободных радикалов в печени мышей, что свидетельствует об истощении ресурсов антиоксидантной системы. В частности, отмечено снижение активности каталазы в 2 раза при действии как наночастиц дисилицида хрома, так и нитрида титана. Результаты этого исследования показали, что наночастицы дисилицида хрома и нитрида титана нарушают экспрессию гена *FABP4* в печени мышей, что отражает генотоксическое действие исследуемых наночастиц, однако молекулярные механизмы их влияния на геном требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: экспрессия мРНК, *FABP4*, наночастицы дисилицида хрома, наночастицы нитрида титана, печень мышей, каталаза.

GENOTOXIC AND CYTOTOXIC EFFECTS OF TITANIUM NITRIDE AND CHROMIUM DISILICIDE NANOPARTICLES AS A CRITERION FOR THE EFFECT ON THE BODY

*A. P. Yavorovsky¹, D. O. Minchenko^{1,2}, N. V. Solokha¹,
A. M. Shish³, O. H. Minchenko² (Kyiv, Ukraine)*

¹Bohomolets National Medical University; ²Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine; ³Bogomoletz Institute of Physiology

We have studied the effect of chromium disilicide and titanium nitride nanoparticles on the expression level of gene *FABP4* (fatty acid binding protein 4), which reflects the cell stress condition, including the endoplasmic reticulum stress. It was shown that treatment of mice by titanium nitride and chromium disilicide nanoparticles (20 mg with food every working day for 2 months) upregu-

lated the expression of *FABP4* gene in mouse liver but effect of chromium disilicide was much stronger. It was also found reduced level of free radicals production in the liver of mice, which indicating depletion of the antioxidant system. In particular, it was shown the decrease of catalase activity in 2 times upon treatment by both chromium disilicide and titanium nitride nanoparticles. Present study demonstrates that chromium disilicide and titanium nitride nanoparticles affects the expression of *FABP4* gene in mouse liver, which possibly reflects genotoxic activities of both types of nanoparticles, but molecular mechanisms of their action on the genome warrant further investigation.

Key words: mRNA expression, FABP4, chromium disilicide nanoparticles, titanium nitride nanoparticles, mouse liver, catalase.