

ВЛИЯНИЕ СТАБИЛИЗИРОВАННОГО ЦИТРАТОМ НАНОРАЗМЕРНОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА

^{1,2}Проскурнина Е.В., ²Созарукова М.М., ¹Ершова Е.С.,
¹Савинова Е.А., ¹Каменева Л.В., ¹Вейко Н.Н., ¹Костюк С.В.

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва,
e-mail: proskurnina@gmail.com, es-ershova@rambler.ru, savinova.ekaterina96@yandex.ru,
larisa.kameneva@yandex.ru, satelit32006@yandex.ru, svet-vk@yandex.ru;

²ФГБУН «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова
Российской академии наук», Москва, e-mail: s_madinam@bk.ru

Цель исследования – изучить влияние стабилизированного цитратом наноразмерного диоксида церия на гены окислительного метаболизма в эмбриональных фибробластах легких человека в отношении жизнеспособности клеток, экспрессии белков NOX4 и NRF2, окислительного повреждения / репарации ДНК. Наночастицы получали термогидролизом гексанитратоцерата(IV) аммония и модифицировали путем постепенного добавления по каплям к раствору цитрата аммония. Определяли гидродинамический диаметр методом динамического рассеяния света и дзета-потенциал. Наночастицы культивировали с клетками в течение 1, 3, 24 и 72 ч. Для оценки выживаемости клеток использовали стандартный 72-часовой МТТ-тест (тест с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромидом), на основании которого выбрали концентрации для исследования 5 нМ и 1,5 мкМ. Экспрессию белков определяли методом проточной цитометрии. Окислительное повреждение ДНК и уровень двухцепочечных разрывов оценивали по количеству 8-оксо-2'-дезоксигуанозина и фосфорилированного гистона γ H2AX. Активность систем репарации оценивали по экспрессии BRCA. Показано, что наночастицы проникают в клетки в течение 1–3 ч, что приводит к активации NOX4, NRF2 примерно в 2 раза по отношению к контролю, окислительному повреждению ДНК и двухцепочечным разрывам примерно в 1,8 раза по отношению к контролю и, как следствие, к активации систем репарации примерно в 3 раза; через 72 ч эти эффекты исчезали. Таким образом, стабилизированный цитратом наноразмерный диоксид церия можно рассматривать как вещество с краткосрочным противовоспалительным действием.

Ключевые слова: стабилизированный цитратом наноразмерный диоксид церия, NOX4, NRF2, окислительное повреждение ДНК

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 24-25-00088.

EFFECT OF CITRATE-COATED NANOCERIA ON THE EXPRESSION OF OXIDATIVE METABOLISM GENES IN HUMAN EMBRYONIC LUNG FIBROBLASTS

^{1,2}Proskurnina E.V., ²Sozarukova M.M., ¹Ershova E.S.,
¹Savinova E.A., ¹Kameneva L.V., ¹Veiko N.N., ¹Kostyuk S.V.

¹Research Centre for Medical Genetics named after Academician N.P. Bochkov, Moscow,
e-mail: proskurnina@gmail.com, es-ershova@rambler.ru, savinova.ekaterina96@yandex.ru,
larisa.kameneva@yandex.ru, satelit32006@yandex.ru, svet-vk@yandex.ru;

²Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
Moscow, e-mail: s_madinam@bk.ru

The objective of the study was to investigate the effect of citrate-stabilized nanosized cerium dioxide on oxidative metabolism genes in human embryonic lung fibroblasts in terms of cell viability, NOX4 and NRF2 protein expression, and oxidative DNA damage/repair. Nanoparticles were obtained by thermal hydrolysis of ammonium hexanitrate(IV) cerate and modified by gradual dropwise addition to ammonium citrate solution. Hydrodynamic diameter and zeta potential were determined by dynamic light scattering. Nanoparticles were cultured with cells for 1, 3, 24, and 72 h. Standard 72-h MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay) was used to assess cell survival, based on which concentrations of 5 nM and 1.5 μ M were selected for the study. Protein expression was determined by flow cytometry. Oxidative DNA damage and the level of double-strand breaks were assessed by the amount of 8-oxo-2'-deoxyguanosine and phosphorylated histone γ H2AX. The activity of repair systems was assessed by the expression of BRCA. It was shown that nanoparticles penetrate into cells within 1–3 hours, which leads to the activation of NOX4, NRF2 approximately twofold compared to the control, oxidative DNA damage and double-strand breaks approximately 1.8 times compared to the control and, as a result, the activation of repair systems approximately threefold; after 72 hours, these effects disappeared. Thus, citrate-stabilized nanoceria can be considered a substance with a short-term anti-inflammatory effect.

Keywords: citrate-coated nanoceria, NOX4, NRF2, oxidative DNA damage

The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation grant № 24-25-00088.

Введение

Последние достижения в области фармацевтической науки и практики привели к развитию новой области – нанофармацевтики, что делает актуальными проблемы качества, контроля эффективности и безопасности нанопрепаратов. Цито- и генотоксичность имеют особое значение для неорганических наночастиц, характеризующихся плохой биоразлагаемостью.

Наночастицы диоксида церия являются весьма перспективными нанофармпрепаратами благодаря своему уникальному взаимодействию с активными формами кислорода (АФК) [1]. Наноразмерный CeO_2 проявляет выраженные ферментоподобные (нанозимные) свойства, являясь миметиком супероксиддисмутазы (СОД), а также пероксидазы, каталазы, фосфатазы. Несмотря на многочисленные исследования, активность наноразмерного диоксида церия по отношению к генам изучена в основном на модели животных. По отношению к клеткам человека токсичность изучена, главным образом, на модели раковых клеток [2]. Исследования на культурах неопухолевых клеток относительно малочисленны (например, это работы по исследованию кератиноцитов кожи [3], пигментного эпителия сетчатки [4]). В целом, систематических исследований влияния диоксида церия на гены нормальных клеток человека, участвующих в окислительном метаболизме и регуляции ключевых АФК-зависимых сигнальных путей, не проводилось.

Цель исследования – изучить влияние стабилизированного цитратом наноразмерного диоксида церия на гены окислительного метаболизма в эмбриональных фибробластах легких человека в отношении: (1) жизнеспособности клеток, (2) экспрессии NOX4 и NRF2, (3) окислительного повреждения / репарации ДНК.

Материалы и методы исследования

Синтез и физико-химическая характеристика наночастиц CeO_2 . Нестабилизированный коллоидный раствор CeO_2 получали термогидролизом гексанитратоцерата(IV) аммония (#215473, Sigma) [5]. Концентрацию золя CeO_2 определяли термогравиметрическим методом. Раствор модификатора готовили путем растворения цитрата аммония (#247561, Sigma) в деионизированной воде. Модификацию наночастиц CeO_2 проводили путем постепенного добавления по каплям при непрерывном перемешивании не менее 30 мин водного раствора диоксида церия к раствору лиганда. Рентгенограммы образцов нанодисперсного CeO_2 были по-

лучены с помощью дифрактометра Bruker D8 Advance ($\text{CuK}\alpha$ -излучение, геометрия θ – 2θ). Идентификацию дифракционных максимумов осуществляли с использованием банка данных ICDD PDF2. Электронные изображения получали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Leo 912 AB Omega (Carl Zeiss, Германия). Гидродинамический диаметр наночастиц измеряли с помощью анализатора Photocor Complex (Photocor, Россия). Для измерения дзета-потенциалов использовали Nano ZS Zetasizer (Malvern Panalytical, UK) в соответствии с ISO/TR 19997:2018.

Культивирование клеток. Эмбриональные фибробласты легких человека (4-й пассаж) рассеивали в концентрации $1,7 \times 10^4$ кл/мл в культуральной среде DMEM («Панэко», Россия), содержащей 1-% фетальную телячью сыворотку (РАА, Австрия), 50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 10 мкг/мл гентамицина. Клетки культивировали при 37°C в течение 24 ч, далее добавляли наночастицы и инкубировали в течение 1, 3, 24 и 72 ч.

МТТ-тест. Для оценки выживаемости клеток проводили МТТ-тест (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид). Флуоресценцию при 550 нм измеряли на планшетном ридере EnSpire (EnSpire Equipment, Финляндия). В качестве отрицательного контроля использовали клетки, инкубированные с культуральной средой и раствором цитрата в деионизированной воде. С наночастицами CeO_2 клетки инкубировали в течение 72 ч.

Проточная цитометрия. Клетки промывали раствором Версена (Thermo Fisher Scientific, США), обрабатывали 0,25%-ным трипсином («Панэко», Россия), промывали средой, суспендировали в фосфатном буферном растворе (PBS, pH 7,4) («Панэко», Россия), фиксировали параформальдегидом (Sigma-Aldrich, США) при 37°C в течение 10 мин, трижды промывали 0,5%-ным BSA-PBS, обрабатывали 0,1%-ным Triton X-100 в PBS в течение 15 мин при 20°C . Далее окрашивали конъюгированными антителами (1 мкг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре, промывали PBS и анализировали с помощью проточного цитометра (CytoFlex S, Beckman Coulter, США).

Результаты исследования и их применение

МТТ-тест. Результаты МТТ-теста свидетельствуют о том, что стабилизированный цитратом CeO_2 безопасен для клеток в широком диапазоне концентраций (рис. 1). Для дальнейших экспериментов выбраны концентрации 5 нМ и 1,5 мкМ.

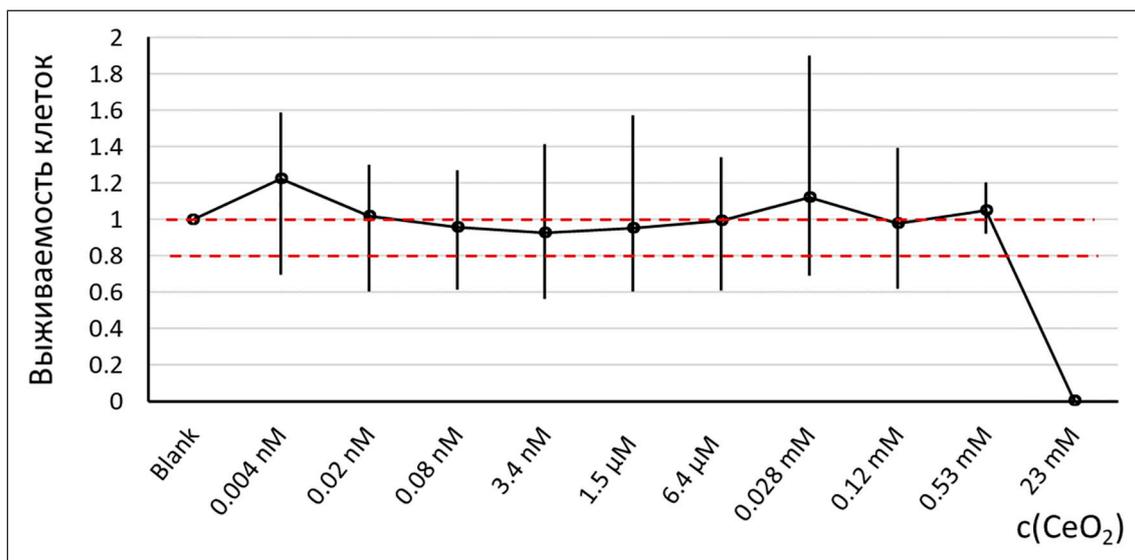


Рис. 1. Результаты 72-часового МТТ-теста. Пунктирными линиями отмечены линия контроля (выживаемость 1) и граница биологического эффекта (выживаемость клеток 0,8)

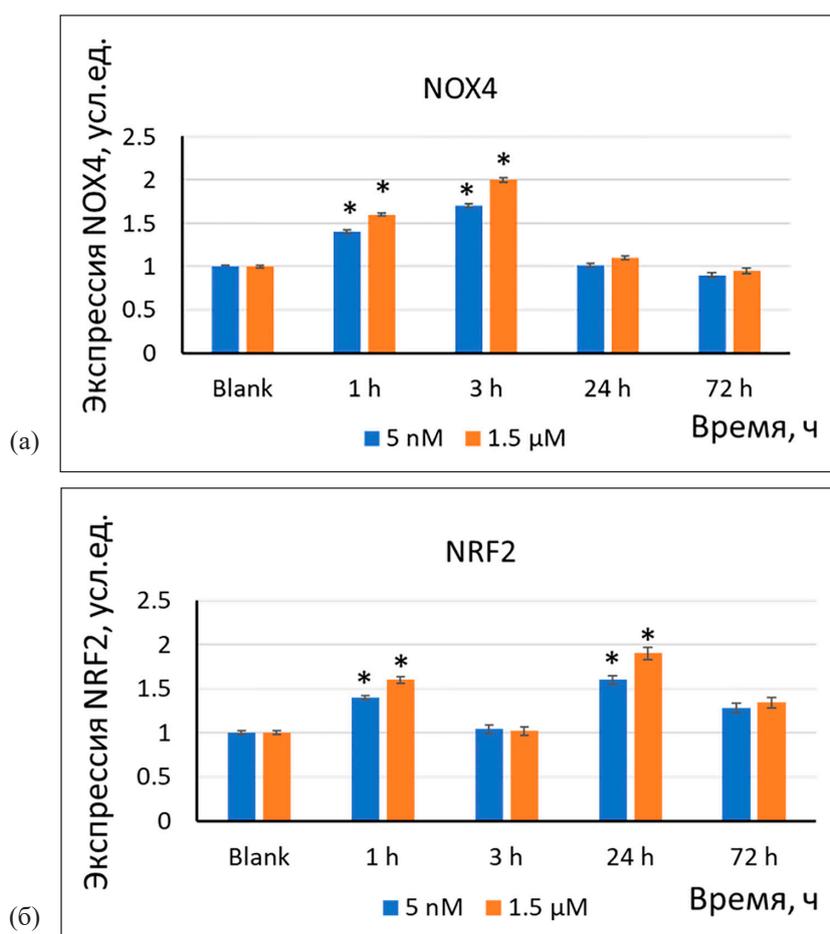


Рис. 2. Экспрессия белков (а) NOX4 (б) и NRF2 в результате инкубации клеток с наночастицами стабилизированного цитратом CeO_2 (5 нМ, 1,5 мкМ) в течение 1–72 ч. Значимые различия по критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$) отмечены знаком *

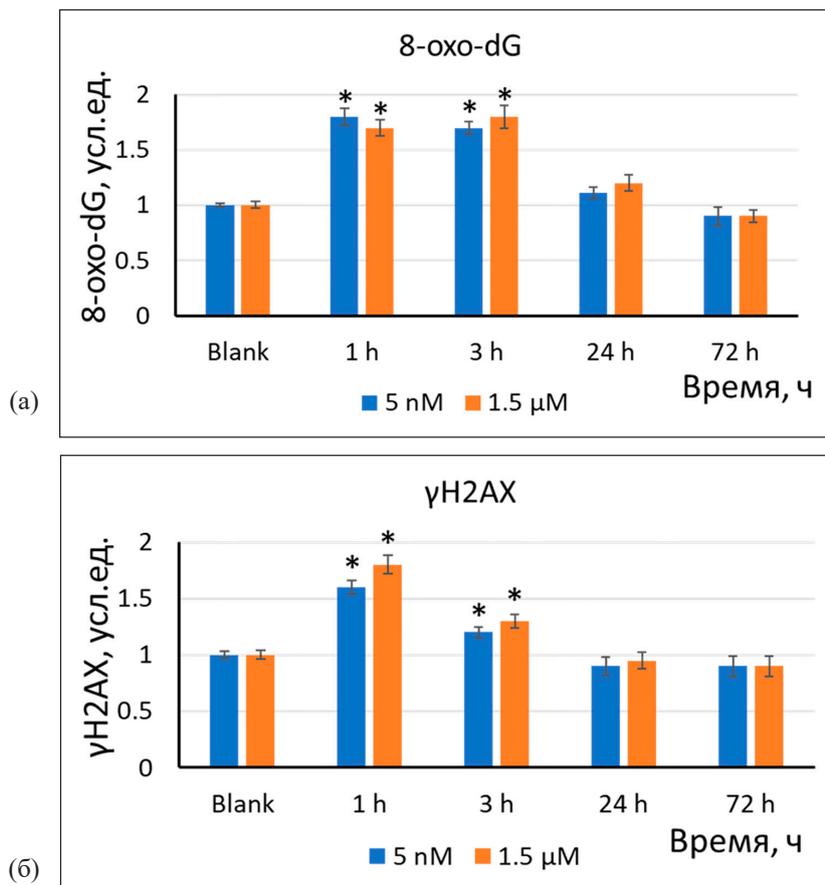


Рис. 3. Уровни (а) 8-охо-dG и (б) γH2AX в результате инкубации клеток с наночастицами стабилизированного цитратом CeO₂ (5 нМ, 1,5 мкМ) в течение 1–72 ч. Значимые различия по критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$) отмечены знаком *

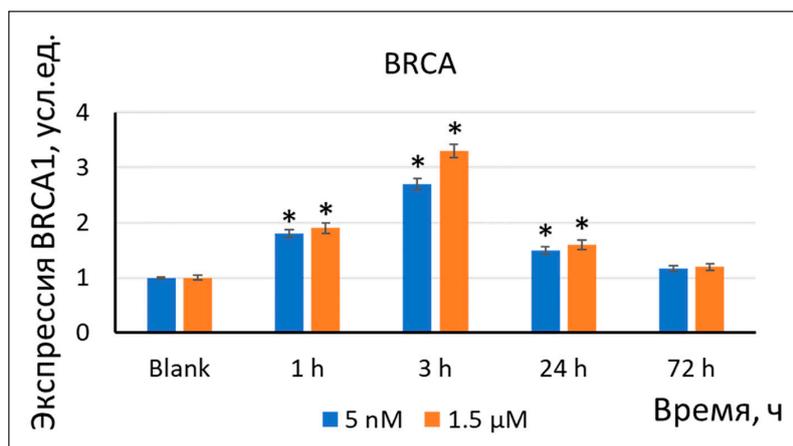


Рис. 4. Экспрессия белка BRCA1 в результате инкубации клеток с наночастицами стабилизированного цитратом CeO₂ (5 нМ, 1,5 мкМ) в течение 1–72 ч. Значимые различия по критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$) отмечены знаком *

Экспрессия NOX4 и NRF2. Ключевыми источниками АФК в клетке являются НАДФН-оксидазы. Спустя 1–3 ч после добавления наночастиц к клеткам экс-

прессия белка NOX4 увеличилась в 1,4–2,0 раза (рис. 2а). Фактор транскрипции NRF2 участвует в антиоксидантном ответе. Экспрессия транскрипционного фактора

NRF2 увеличилась в 1,5–2 раза через 24 ч (рис. 2б). Кратковременная активность фактора NRF2, скорее всего, связана с высвобождением его из белковых комплексов с KEAP1 и фосфорилированием NRF2, депонированного в клетках. Повышение активности через 24 ч инкубации является результатом ответа на повышение экспрессии NOX4.

Окислительное повреждение и репарация ДНК. Спустя 1–3 ч инкубации клеток с наночастицами (5 нМ, 1,5 мкМ) уровень 8-оксо-2'-дезоксигуанозина (8-охо-dG), являющегося маркером окислительного повреждения ДНК, увеличился в 1,8–2,7 раза (рис. 3а). Увеличение 8-охо-dG может служить причиной разрывов ДНК. Уровень двухцепочечных разрывов ДНК был оценен по концентрации фосфорилированного гистона γ H2AX. Спустя 1 ч инкубации с наночастицами уровень γ H2AX увеличился в 1,5–1,8 раза, что коррелирует с изменениями 8-охо-dG (рис. 3б).

Уменьшение разрывов ДНК может быть обусловлено активацией генов, участвующих в репарации ДНК. Ключевым геном репарации является ген BRCA1. В результате действия наночастиц (5 нМ, 1,5 мкМ) на клетки через 1–3 ч экспрессия белка BRCA1 увеличилась в 1,5–3,5 раза (рис. 4). Увеличение экспрессии белка BRCA1 в течение 24 ч объясняет уменьшение двухцепочечных разрывов через 24–72 ч после добавления CeO_2 .

Основные результаты исследования можно суммировать следующим образом: 1) стабилизированный цитратом наноразмерный диоксид церия не проявляет токсичности по отношению к эмбриональным фибробластам легких человека в широком диапазоне концентраций до 0,53 мМ; 2) он быстро проникает в клетки в течение 1–3 ч, при этом увеличивается экспрессия NOX4 и NRF2; 3) увеличение экспрессии NOX4 приводит к окислительному повреждению ДНК и двухцепочечным разрывам, что, в свою очередь, активирует системы репарации; 4) как в низкой (5 нМ), так и в 300 раз более высокой концентрации (1,5 мкМ) наночастицы действуют примерно с одинаковой эффективностью. Эффекты диоксида церия развиваются довольно быстро – в течение 24 ч – и исчезают через 72 ч, что, предположительно, связано с удалением CeO_2 из клеток.

Цитрат-анион – широко используемый стабилизатор наночастиц. Несмотря на то что цитрат аммония – нейтральное вещество, но в качестве стабилизатора он может влиять на токсичность. Например, цитрат-стабилизированные наночастицы сере-

бра оказались более токсичными для кератиноцитов человека, чем стабилизированные полиэтиленгликолем [6]. Однако на клетках гепатомы наночастицы серебра, стабилизированные цитратом и полиэтиленгликолем, проявили схожую токсичность [7]. Кроме того, на токсичность влияет и способ приготовления суспензии. Цитратное покрытие не мешало связыванию олигонуклеотидов с золотыми наночастицами, однако большое количество цитрата на поверхности золотых частиц увеличивало их токсичность, хотя и не влияло на проникновение в эндотелиальные или эпителиальные клетки [8]. Авторами не найдено работ, посвященных оценке токсичности цитрат-стабилизированного диоксида церия по отношению к клеткам человека. На фибробластах мышей цитрат как стабилизатор диоксида церия проявлял токсичность по сравнению с полиакриловой кислотой [9]. Согласно полученным данным, цитрат как стабилизатор диоксида церия является безопасным, а цитрат-стабилизированные наночастицы проявляют в целом цитопротекторные свойства. Поскольку эффекты наночастиц развиваются достаточно быстро (в течение 1 ч), можно предположить, что цитрат не препятствует проникновению в фибробласты.

Наночастицы диоксида церия вызывают активацию экспрессии NOX4 [10]. Фермент NOX4 катализирует продукцию супероксидного анион-радикала и пероксида водорода, что ставит его в один ряд с важнейшими окислительно-восстановительными регуляторами. Повышение активности NOX4 приводит к активации противовоспалительного ответа NRF2, тем самым клетка защищается от повреждения. Негативный эффект NOX4 заключается в окислительном повреждении ДНК и возникновении двухцепочечных разрывов. В свою очередь, в ответ на повреждение ДНК происходит активация систем репарации.

Относительно токсичности и безопасности наноразмерного диоксида церия в литературе имеются противоречивые данные. Исследования на культурах альвеолярных эпителиальных клеток II типа у крыс свидетельствуют о провоспалительном и оксидативном действии диоксида церия [11]. В отношении клеток рака легких CeO_2 вызывал выраженный окислительный стресс, перекисное окисление липидов и повреждение мембран. Ченг с соавт. показали, что наночастицы CeO_2 вызывают повреждение и апоптоз в клетках гепатомы человека посредством окислительного стресса и активации сигнальных путей MAPK [12]. Токсическое действие CeO_2 на клетки аденокарциномы легких было продемон-

стрировано Митталом с соавт. [13]. Напротив, в исследовании клеток рака яичников и толстой кишки человека CeO_2 продемонстрировал антиоксидантные и противовоспалительные свойства [14]. Одновременное введение CeO_2 и ацетата свинца снижало генотоксичность, воспаление и образование АФК, восстанавливая целостность геномной ДНК [15].

Заключение

Активный участник биохимических реакций с участием АФК, диоксид церия проявляет свою окислительно-восстановительную активность в клетках, регулируя АФК-зависимые пути и активируя экспрессию NOX4. В течение 24 ч разворачивается каскад событий, включающий окислительную модификацию ДНК и двухцепочечные разрывы и одновременно активацию защитных систем: антиоксидантного пути NRF2 и систем репарации ДНК. Таким образом, стабилизированный цитратом диоксид церия можно рассматривать как вещество с кратковременным противовоспалительным действием.

Список литературы

1. Saifi M.A., Seal S., Godugu C. Nanoceria, the versatile nanoparticles: Promising biomedical applications // *J. Control Release*. 2021. Vol. 338. P. 164-189.
2. Lin W., Huang Y.W., Zhou X.D., Ma Y. Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells // *Int. J. Toxicol.* 2006. Vol. 25. No. 6. P. 451-457.
3. Ngoc L.T.N., Bui V.K.H., Moon J.Y., Lee Y.C. In-Vitro Cytotoxicity and Oxidative Stress Induced by Cerium Aminoclay and Cerium Oxide Nanoparticles in Human Skin Keratinocyte Cells // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2019. Vol. 19. No. 10. P. 6369-6375.
4. Ma Y., Li P., Zhao L., Liu J., Yu J., Huang Y., Zhu Y., Li Z., Zhao R., Hua S., Zhu Y., Zhang Z. Size-Dependent Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species of Cerium Oxide Nanoparticles in Human Retinal Pigment Epithelia Cells // *Int. J. Nanomedicine*. 2021. Vol. 16. P. 5333-5341. DOI: 10.2147/IJN.S305676.
5. Shcherbakov A.B., Teplonogova M.A., Ivanova O.S., Istomin S.Ya., Ivonin I.V., Baranchikov A.E., Ivanov V.V. Facile method for fabrication of surfactant-free concentrated CeO_2 sols // *Materials Research Express*. 2017. Vol. 4. No. 5. P. 055008.
6. Bastos V., Ferreira de Oliveira J.M., Brown D., Jonhston H., Malheiro E., Daniel-da-Silva A.L., Duarte I.F., Santos C., Oliveira H. The influence of Citrate or PEG coating on silver nanoparticle toxicity to a human keratinocyte cell line // *Toxicol Lett*. 2016. Vol. 249. P. 29-41.
7. Bastos V., Ferreira-de-Oliveira J.M.P., Carrola J., Daniel-da-Silva A., Duarte I., Santos C., Oliveira H. Coating independent cytotoxicity of citrate- and PEG-coated silver nanoparticles on a human hepatoma cell line // *J. Environ Sci (China)*. 2017. Vol. 51. P. 191-201.
8. Freese C., Uboldi C., Gibson M.I., Unger R.E., Weksler B.B., Romero I.A., Couraud P.-O., Kirkpatrick C.J. Uptake and cytotoxicity of citrate-coated gold nanospheres: Comparative studies on human endothelial and epithelial cells // *Part Fibre Toxicol*. 2012. Vol. 9. P. 23.
9. Ould-Moussa N., Safi M., Guedeau-Boudeville M.A., Montero D., Conjeaud H., Berret J.F. In vitro toxicity of nanoceria: effect of coating and stability in biofluids // *Nanotoxicology*. 2014. Vol. 8. No. 7. P. 799-811.
10. Guo S., Chen X. The human Nox4: gene, structure, physiological function and pathological significance // *J. Drug Target*. 2015. Vol. 23. No. 10. P. 888-896.
11. Schwotzer D., Niehof M., Schaudien D., Kock H., Hansen T., Dasenbrock C., Creutzenberg O. Cerium oxide and barium sulfate nanoparticle inhalation affects gene expression in alveolar epithelial cells type II // *J. Nanobiotechnology*. 2018. Vol. 16. No. 1. P. 16.
12. Cheng G., Guo W., Han L., Chen E., Kong L., Wang L., Ai W., Song N., Li H., Chen H. Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways // *Toxicol. In Vitro*. 2013. Vol. 27. No. 3. P. 1082-1088.
13. Mittal S., Pandey A.K. Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: role of ROS mediated DNA damage and apoptosis // *Biomed. Res. Int*. 2014. Vol. 2014. P. 891934.
14. Vassie J.A., Whitelock J.M., Lord M.S. Endocytosis of cerium oxide nanoparticles and modulation of reactive oxygen species in human ovarian and colon cancer cells // *Acta Biomater*. 2017. Vol. 50. P. 127-141.
15. Mohamed H.R.H. Acute Oral Administration of Cerium Oxide Nanoparticles Suppresses Lead Acetate-Induced Genotoxicity, Inflammation, and ROS Generation in Mice Renal and Cardiac Tissues // *Biol. Trace Elem. Res*. 2022. Vol. 200. No. 7. P. 3284-3293.