

УДК 612.112.94+57.04

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛИМФОЦИТОВ
ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ
В ПРИСУТСТВИИ РЕСВЕРАТРОЛА И КОФЕИНА****М.А. Наквасина, В.Е. Пономаренко, В.Г. Артюхов**

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

Серебряные наночастицы – приоритетные техногенные наночастицы, которые нашли широкое применение в промышленности, оптике, медицине. Высокая биологическая активность техногенных наночастиц обуславливает потенциальные риски возникновения нежелательных токсических эффектов для работников предприятий и потребителей продукции наноиндустрии. В связи с этим одной из актуальных проблем бионанотехнологии и наномедицины является изучение возможных токсикологических эффектов серебряных наночастиц (СНЧ) и выявление перспектив их применения в клинической практике.

Механизмы и последствия модифицирующего действия наночастиц серебра на лимфоцитарные клетки человека изучены недостаточно. Ранее нами было установлено [1], что воздействие наночастиц серебра (2–12 нм) на лимфоциты человека индуцирует по сравнению с контролем снижение уровня жизнеспособности клеток, РНК, активности лактатдегидрогеназы, глутатионредуктазы, цитозольного кальция, повышение количества внутриклеточных активных форм кислорода, изменения поверхностной архитектоники клеток, нарушения степени гидрофобности и зарядового состояния их плазматических мембран. Обнаружено, что наночастицы серебра инициируют процессы гибели клеток по механизму этоза, который сопровождается выбросом хроматина во внеклеточную среду и образованием внеклеточных ловушек. Не исключено, что образование внеклеточных ловушек лимфоцитами после воздействия наночастиц серебра, обнаруженное нами в условиях *in vitro*, может реализоваться в организме и будет способствовать усилению антимикробных свойств исследуемых наночастиц. Однако гибель лимфоцитов и избыточное образование внеклеточных лимфоцитарных ловушек могут вызывать нарушение иммунного ответа, развитие воспалительных и аутоиммунных заболеваний, а также тромбообразование. В этой связи представляется необходимым проведение исследований, направленных на поиск соединений, способных оказывать защитное действие на иммунциты в условиях воздействия СНЧ.

Ресвератрол – соединение фенольной природы растительного происхождения с широким спектром биологической активности, в том числе противовоспалительной, антиоксидантной, антиканцерогенной. Ресвератрол активирует теломеразу и влияет на процессы апоптотической гибели клеток. Нами обнаружено защитное действие транс-ресвератрола (10^{-6} моль/л) по отношению к уровню жизнеспособности лимфоцитов после воздействия пероксида водорода (10^{-5} моль/л) [2]. Протекторный эффект ресвератрола обусловлен его способностью снижать уровень активных форм кислорода (АФК) в интактных и модифицированных пероксидом водорода иммунocyтах. Выявлена антирадикальная активность ресвератрола по отношению к пероксиду водорода.

Кофеин – блокатор фосфодиэстеразы, разрушающей цАМФ, способный влиять на клеточный цикл и активность ключевых регуляторных белков, выступать в роли антиоксиданта и индуцировать апоптоз – соответственно в низких и высоких концентрациях. Нами выявлен антиапоптотический эффект кофеина (10^{-4} моль/л) по отношению к фотомодифицированным лимфоцитам, связанный с его способностью снижать уровень АФК в интактных и УФ-облученных клетках и инактивировать пероксид водорода [3].

С целью выявления возможного защитного эффекта этих соединений на лимфоциты в условиях воздействия СНЧ нами исследованы изменения уровня жизнеспособности и внутриклеточных активных форм кислорода лимфоцитов человека после воздействия наночастиц серебра в присутствии ресвератрола и кофеина в конечной концентрации 10^{-4} моль/л.

Коллоидный раствор серебра получали путем восстановления AgNO_3 гидроксиламином гидрохлоридом [4] с последующей обработкой в течение 5 мин на ультразвуковом гомогенизаторе Sonicators Q500 («Qsonica», США) при мощности 5 Вт и частоте 22 кГц. Размеры наночастиц серебра, определенные с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии (микроскоп LIBRA 120 PLUS, «Carl Zeiss», Германия) на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета (ЦКП ВГУ), составили 2 ± 12 нм.

Лимфоциты получали путем центрифугирования гепаринизированной донорской крови в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,077$ г./см³) [5]. Число жизнеспособных лимфоцитов в пробах определяли методом эксклюзии трипанового синего [5]. Внутриклеточный уровень АФК исследовали с помощью флуоресцентного зонда 2', 7'-дихлорфлуоресцеин диацетата (DCFH-DA) на спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 [6]. В работе использовали транс-ресвератрол (Shaanxi Hongao Bio-Tech Inc., Китай) и кофеин (Panreac Applichem, Испания, Германия) в конечной концентрации 10^{-4} моль/л. Суспензии лимфоцитов ($2 \cdot 10^6$ кл/мл) в растворе Хенкса предварительно инкубировали с растворами ресвератрола и кофеина в течение 30 мин, затем добавляли коллоидный раствор серебра в соотношении по объему 1:0,1. Суспензии интактных и модифицированных лимфоцитов в растворе Хенкса инкубировали в микропробирках при 37⁰ С в течение 1 ч в присутствии CO₂.

Ресвератрол не влиял на уровень жизнеспособности интактных лимфоцитов (рис. 1). После воздействия СНЧ на иммунциты наблюдалось статистически значимое снижение величины исследуемого параметра по сравнению с таковой для нативных лимфоцитов. В присутствии ресвератрола уровень жизнеспособности лимфоцитов после модификации клеток наночастицами серебра не отличался от контроля (интактные клетки).

При исследовании влияния серебряных наночастиц на уровень жизнеспособности лимфоцитов в отсутствие и в присутствии кофеина выявлено (рис. 2), что кофеин практически полностью сохранял жизнеспособность лимфоцитов человека, модифицированных СНЧ. Величина исследуемого параметра для лимфоцитов после воздействия СНЧ в присутствии кофеина не отличалась от таковой для интактных клеток.

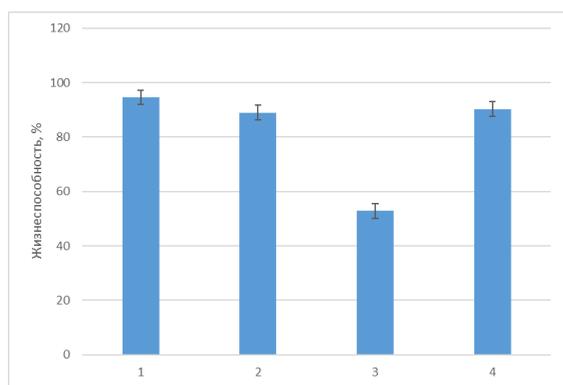


Рис. 1. Изменение уровня жизнеспособности лимфоцитов после воздействия серебряных наночастиц в присутствии ресвератрола: 1 – интактные клетки; 2 – после воздействия ресвератрола; 3 – после воздействия СНЧ; 4 – после воздействия СНЧ в присутствии ресвератрола

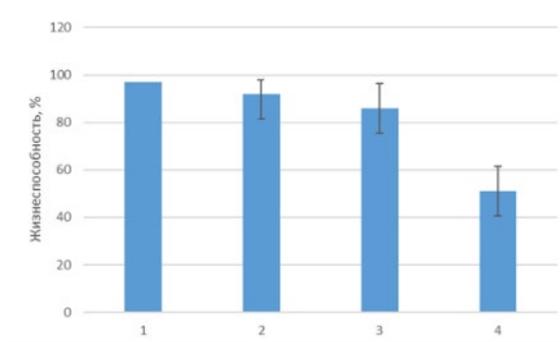


Рис. 2. Изменение уровня жизнеспособности лимфоцитов после воздействия серебряных наночастиц в присутствии кофеина: 1 – интактные клетки; 2 – после воздействия кофеина; 3 – после воздействия СНЧ в присутствии кофеина; 4 – после воздействия СНЧ

С целью выявления механизмов защитного действия ресвератрола и кофеина по отношению к лимфоцитам человека в условиях воздействия СНЧ были исследованы изменения уровня внутриклеточных активных форм кислорода в клетках в отсутствие и в присутствии используемых модифицирующих агентов (табл. 1).

Наибольший уровень продукции внутриклеточных активных форм кислорода зарегистрирован после воздействия СНЧ на лимфоциты (38 ± 10 отн. ед.). Следовательно, снижение уровня жизнеспособности иммунцитов в условиях воздействия серебряных наночастиц обусловлено генерацией АФК, запускающих процессы клеточной гибели. Но снижение уровня жизнеспособности клеток в среде с СНЧ может быть связано и с другими причинами, в частности, освобождением с поверхности наночастиц токсичных ионов серебра, а также с взаимодействием серебряных наночастиц с биомолекулами на поверхности и внутри клеток [1, 4].

В присутствии кофеина и ресвератрола уровень АФК в немодифицированных клетках не отличался от такового для интактных лимфоцитов. После воздействия на лимфоциты СНЧ в присутствии кофеина и ресвератрола наблюдалось снижение продукции АФК по сравнению с уровнем исследуемого параметра для лимфоцитов, модифицированных наночастицами. Причем ресвератрол проявлял в этом отношении более высокую эффективность, чем кофеин. Вероятно, снижение уровня АФК в лимфоцитах в присутствии кофеина и ресвератрола обусловлено их антиоксидантными свойствами.

Таблица 1. Изменения уровня внутриклеточных активных форм кислорода в лимфоцитах после воздействия серебряных наночастиц в присутствии ресвератрола и кофеина

Образец	Уровень АФК, отн. ед.
Интактные клетки	15±3
После воздействия СНЧ	38±10
Кофеин	17±5
Ресвератрол	11±2
После воздействия СНЧ в присутствии кофеина	23±6
После воздействия СНЧ в присутствии ресвератрола	19±7

Таким образом, нами выявлено, что в условиях воздействия серебряных наночастиц на лимфоциты кофеин и ресвератрол (10^{-4} моль/л) повышают уровень жизнеспособности клеток и снижают уровень внутриклеточных активных форм кислорода по сравнению с таковыми для иммунных клеток в отсутствие этих агентов. Защитное действие ресвератрола по отношению к лимфоцитам, модифицированным воздействием пероксида водорода, может быть обусловлено не только ингибированием радикальных соединений, но и встраиванием его молекул в липидный бислой плазматической мембраны, увеличением степени ее жесткости и возрастанием устойчивости к пероксидному окислению липидов.

Следовательно, процессы гибели лимфоцитов, индуцированные СНЧ, связаны с генерацией активных кислородных метаболитов. Ресвератрол и кофеин могут быть использованы как агенты, проявляющие протекторный эффект по отношению к лимфоцитам человека в условиях воздействия серебряных наночастиц.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2020–2022 годы, проект № FZGU-2020-0044.

Литература

1. Наквасина М.А. Наночастицы серебра индуцируют процессы изменения структурно-функциональных характеристик лимфоцитов человека / М.А. Наквасина, И.А. Колтаков, В.Г. Артюхов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2020. Т. 170, № 10. С. 515–521. DOI: 10.1007/s10517-021-05096-5.
2. Структурно-функциональные модификации лимфоцитов человека в динамике апоптоза, индуцированного воздействием пероксида водорода / М.А. Наквасина, Т.И. Старикова, В.Г. Артюхов // Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ – 2021: материалы 16-й международной научной конференции, г. Севастополь, 13–17 сентября 2021 г. Севастополь, 2021. С. 149.
3. Наквасина М.А., Токмакова Е.В., Колтаков И.А., Артюхов В.Г. Антиапоптотические эффекты кофеина, генистеина и верапамила по отношению к УФ-облученным лимфоцитарным клеткам // Радиационная биология. Радиоэкология, 2019. Т. 59, № 6. С. 592–598. DOI: 10.1134/S0869803119050084.
4. Нанобиотехнологии: практикум / под ред. А.Б. Рубина. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012, 384 с.
5. Лимфоциты. Методы. Под ред. Дж. Клауса. М., 1990. 395 с.
6. Rastogi R.P., et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. V. 397, № 3. P. 603–607. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.006.