

УДК 57.085.23

НАНОЧАСТИЦЫ ДИОКСИДА ТИТАНА ПОДАВЛЯЮТ ЭНТОЗ В КУЛЬТУРЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА MCF-7

© 2023 г. О. П. Кисурин-Евгеньева¹ *, М. А. Савицкая¹, Д. С. Смешнова¹, Г. Е. Онищенко¹¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*E-mail: evgengeva@mail.ru

Поступила в редакцию 31.10.2022 г.

После доработки 09.02.2023 г.

Принята к публикации 21.02.2023 г.

Наночастицы TiO_2 широко применяются в промышленности, фармакологии, медицине. В последнее время предлагается использовать наночастицы TiO_2 для адресной доставки химиотерапевтических препаратов, что может привести к увеличению локальной концентрации TiO_2 и оказать влияние на протекающие в опухоли процессы, в т.ч. на энтоз (внедрение одной опухолевой клетки в другую). В настоящей работе проведено исследование влияния наночастиц TiO_2 (частиц минерала анатаз размером менее 25 нм и частиц, состоящих из смеси анатаза и рутила, размером менее 75 нм в концентрации 1, 10 или 100 мкг/мл в течение 72 ч) на процесс энтоза в культуре клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7. Культивирование клеток в присутствии разных типов наночастиц TiO_2 замедляет пролиферацию и вызывает уменьшение числа энтозов. Элементный анализ с помощью аналитической электронной микроскопии выявил присутствие TiO_2 в эндосомном компартменте, в цитозоле и во внеклеточном пространстве. Методом иммунохимического окрашивания показано, что оба типа наночастиц TiO_2 в концентрации 10 мкг/мл нарушают образование адгезивных контактов, в т.ч. и на ранних стадиях энтоза. Воздействие частиц анатаза индуцирует транслокацию белка p53 в ядра клеток. В целом, использованные в работе наночастицы TiO_2 ингибируют энтоз в клетках культуры MCF-7, нарушая адгезивные контакты и препятствуя процессу внедрения. Однако можно предположить, что нарушение адгезивных контактов способно усиливать подвижность опухолевых клеток и метастазирование.

Ключевые слова: адгезивные контакты, диоксид титана, наночастицы, p53, энтоз

DOI: 10.31857/S0041377123030045, **EDN:** VCHENQ

В настоящее время нанотехнологии являются одним из приоритетных направлений развития науки и техники. Наночастицы (от 1 до 100 нм) различного происхождения широко используются в медицине и в промышленности. К таким наночастицам относится диоксид титана (TiO_2), применяемый в фармакологии при изготовлении оболочек таблетированных препаратов, при изготовлении декоративной косметики, в производстве красок и т.д. (Fage et al., 2016). В природе TiO_2 существует в трех формах: рутил, анатаз и брукит (Rossi et al., 2010). Наиболее инертен среди них рутил. Анатаз, в отличие от всех остальных форм, является наиболее реакционно-способным из-за наличия фотокаталитических свойств (Nugum et al., 2005). Цитотоксичность наночастиц TiO_2 была показана на различных типах культивируемых клеток. Наночастицы TiO_2 вызывали генерацию активных форм кислорода и окислительный стресс (Sayes et al., 2006; Hanot-Roy et al., 2016), ацетилирование белков (Sund et al., 2014), изменение фосфопротеома белков, регулирующих процессы апоптоза, внутриклеточного транспорта, воспаления (Biola-Clier et al., 2020), повреждение ДНК и ак-

тивацию апоптоза (Lagopati et al., 2014; Wang et al., 2015; Trang et al., 2021), а также нарушение структуры адгезивных контактов (Setyawati et al., 2013).

Как было показано, при попадании наночастиц TiO_2 в организм при разных способах их введения они накапливаются в тканях почек, печени, легких, головного мозга. Наночастицы оказывали кратковременный токсический эффект, вызывая воспалительную реакцию в легких (Warheit et al., 2006), гистопатологические и функциональные нарушения в тканях печени и почек (Wang et al., 2007). Однако значимого токсического эффекта наночастиц TiO_2 *in vivo* обнаружено не было. В связи с этим, в последнее время разрабатываются способы клинического использования наночастиц TiO_2 в терапии опухолей (в т.ч. на модели клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7) для адресной доставки химиотерапевтических препаратов (Zeng et al., 2015; Ding et al., 2016). Побочным эффектом адресной доставки химиотерапевтических препаратов с использованием наночастиц TiO_2 может являться влияние собственно наночастиц на различные процессы, проходящие в опухолевых тканях, в т.ч. стимулирующих опухоле-

вую прогрессию. Одним из таких процессов является энтоз.

Энтоз представляет собой внедрение одной клетки эпителиального происхождения в другую клетку. Внедрение происходит за счет образования адгезивных контактов и работы актомиозиновой системы внедряющейся клетки. Внедрившаяся клетка может со временем покинуть энтозную вакуоль или подвергнуться лизосомно-опосредованной деградации, что приводит к уменьшению числа опухолевых клеток. С другой стороны, внедрившаяся клетка может служить источником питательных веществ для энтозной (наружной) клетки (Overholtzer et al., 2007; Garanina et al., 2017), способствуя ее выживанию. Кроме того, и наружная, и внедрившаяся клетка могут вступить в митоз (Krishna, Overholtzer, 2016; Кисурина-Евгеньева и др., 2018). Наличие крупной вакуоли нарушает нормальное завершение митоза энтозной клетки, что приводит к появлению полиплоидных клеток и повышению генетической нестабильности опухоли (Krajsovic et al., 2011; Garanina et al., 2017). Таким образом, энтоз может как способствовать, так и препятствовать развитию опухоли.

Целью работы является оценка влияния наночастиц диоксида титана (TiO_2) на протекание процесса энтоза в клетках культуры аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7). При этом использовали два типа наночастиц: анатаз, ≤ 25 нм (далее A25) и смесь анатаза и рутила, ≤ 75 нм (далее AP75).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клетки и наночастицы TiO_2 . Клетки культуры MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека) получены из НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина (Москва). Клетки выращивали в среде DMEM (ПанЭко Россия), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (РАА Laboratories, Австрия) и 80 мг/мл гентамицина (ПанЭко) при 37°C и 5% CO_2 . Клетки высаживали в чашки Петри на покровные стекла в концентрации 200 тыс./мл. Через 24 ч к клеткам добавляли наночастицы TiO_2 в форме анатаза размером менее 25 нм (далее A25) (Sigma, 637254, США) или наночастицы, состоящие из смеси анатаза и рутила, с размером менее 75 нм (далее AP75) (Sigma, 13463-67-7, США). Культивирование клеток в присутствии наночастиц проводили в течение трех сут. Концентрация наночастиц TiO_2 составляла 1, 10 или 100 мкг/мл.

Морфологический анализ. Клетки фиксировали 96% этанолом (-20°C) и окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. На полученных свето-микроскопических препаратах по морфологическим признакам считали число энтозов (энтотический индекс, в %), митозов (митотический индекс, в %) и апоптозов (апоптотический индекс, в %) ($n = 3000$ клеток в каждом из 3-х биологи-

ческих повторов эксперимента; на графиках указаны средние значения и их ошибка). На этих же препаратах (для концентрации наночастиц 10 мкг/мл) оценивали влияние наночастиц на увеличение числа клеток в процессе культивирования (до внесения наночастиц и через 3 сут после внесения). Число клеток считали, используя объектив с увеличением $40\times$ в 10 полях зрения (в 3-х биологических повторах, по 40 полей зрения в каждом, на графиках указаны значения среднего и ошибка среднего).

Иммуноцитохимия и обработка изображений. Для выявления белков β -катенина и p53 клетки фиксировали 4%-ным формальдегидом (02194047-CF, MP Biochemicals, Франция), приготовленным на 0.1 М фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) pH 7.2, обрабатывали 0.1%-ным Тритоном X100 (Sigma, США) и отмывали в 0.1 М PBS pH 7.2. Адгезивные контакты окрашивали мышинными моноклональными антителами против белка β -катенина (C7207; Sigma, США) в течение 30 мин при 37°C . Для выявления белка p53 клетки окрашивали мышинными моноклональными антителами против белка p53 (P5813; Sigma, США) 30 мин при 37°C . В качестве вторых антител использовали антитела против иммуноглобулина мыши, конъюгированные с Alexa Fluor-488 (Invitrogen, США), окрашивали 30 мин при 37°C . Ядра клеток докрашивали красителем DAPI (0.1 мкг/мл) (Sigma, США) 10 мин при комнатной температуре и в темноте.

Препараты анализировали с помощью люминесцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss Inc., Германия). Для Alexa Fluor-488 и DAPI использовали спектры возбуждения/испускания 496/519 и 358/460 соответственно. Для последующей статистической обработки использовали одинаковое время экспозиции в каждом эксперименте. Снимки обрабатывали с помощью программ Adobe Photoshop и ImageJ/Fiji. Измерение длины адгезивных контактов проводили с использованием программного оборудования Vision Bio® Analyze (Россия). На изображениях измеряли общий периметр клеток (P) и длину L межклеточного прикрепления по окрашиванию антителами против белка β -катенина, число измерений n в контроле и в эксперименте составляло 90 и 50 соответственно. Анализировали отношение периметра клетки к протяженности адгезивных контактов (P/L).

Интенсивность флуоресценции белка p53 в ядрах также измеряли с использованием программного оборудования (Vision Bio® Analyze, Россия). Оценивали интенсивность флуоресценции в ядре и в таком же объеме цитоплазмы (фон). Затем с помощью программы Excel вычитали фон, значения интенсивности флуоресценции ядер в усл. ед. ранжировали по возрастанию и делили на три группы: слабо-флуоресцирующие (0–30), средне-флуоресцирующие (30–60) и ярко-флуоресцирующие (60–90). Число проанализированных клеток в контроле — 1467 шт., в присутствии нано-

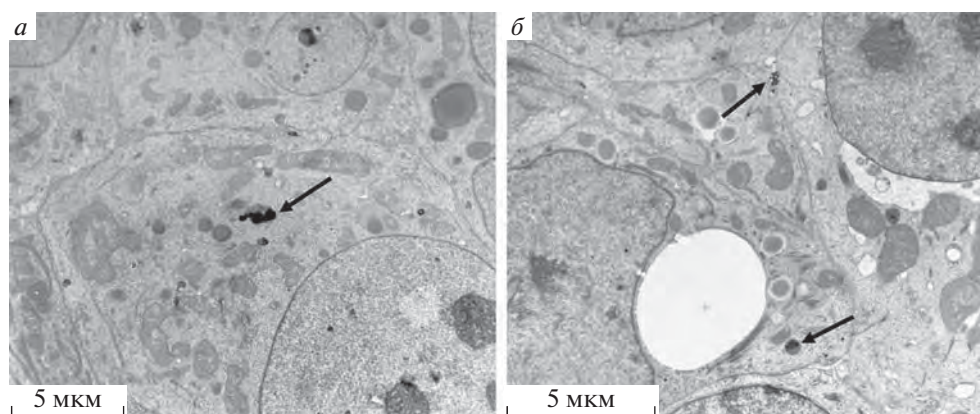


Рис. 1. Электронно-плотные частицы в клетках MCF-7, культивировавшихся в присутствии наночастиц TiO_2 A25 (а) и AP75 (б). Стрелки указывают на электронно-плотные частицы.

частиц A25 в концентрации 1 и 10 мкг/мл – 538 и 114 соответственно, в присутствии 1 и 10 мкг/мл AP – 184 и 143 соответственно.

Эксперименты по анализу длины адгезивных контактов и накоплению р53 в ядрах клеток проводили в двух биологических повторах, затем выборки объединяли. На графиках указывали среднее значение и стандартное отклонение.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Для ультраструктурного анализа клеток с помощью ТЭМ клетки культивировали в присутствии наночастиц TiO_2 (A25 или A75 в концентрации 10 мкг/мл 3 сут). Клетки фиксировали 2,5%-ным глутаровым альдегидом на 0,1 М буфере PBS pH 7,2 30 мин, обезвоживали и заключали в эпон 812 по стандартной методике. В процессе проводки клетки дофиксировали 1%-ным раствором осмия на 0,1 М буфере PBS pH 7,2 и контрастировали 1,5%-ным раствором уранилцетата в 70%-ном этаноле. Ультратонкие срезы толщиной 60 нм изготавливали с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме ЛКВ II (Швеция). Для лучшей визуализации наночастиц дополнительное контрастирование срезов не проводили. Полученные срезы анализировали на трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) и аналитическом трансмиссионном электронном микроскопе JEM-2100 (JEOL, Япония). Элементный анализ наночастиц проводили с использованием метода энерго-дисперсионной спектроскопии (ЭДС) характеристического рентгеновского излучения, основанном на регистрации рентгеновских фотонов, испускаемых образцами при их облучении пучком электронов, и измерении их энергий энерго-дисперсионным спектрометром (Oxford Instruments Inca X-Max 8 mm², Великобритания). Обработку результатов проводили с использованием программного оборудования Inca (Oxford Instruments, Великобритания).

Статистическая обработка. Построение графиков и гистограмм проводили в программе Microsoft Of-

fice Excel 2007. Для проверки гипотезы о различии средних в контроле и экспериментальной группе использовали критерий Манна–Уитни (для малых выборок) или *t*-критерий Стьюдента с подтверждением нормальности распределения. Различие считали статистически достоверным при $p \leq 0,05$. Поскольку энтоз представляет собой редкое явление, при статистической обработке данных, полученных при исследовании энтозных клеток, стандартное отклонение не определяли; при этом указывали число проанализированных энтозов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение наночастиц TiO_2 в клетках MCF-7.

Электронная микроскопия. Для того чтобы убедиться в накоплении наночастиц TiO_2 , как в форме A25, так и AP75, в клетках MCF-7, было проведено электронно-микроскопическое исследование. В клетках были обнаружены скопления электронно-плотных частиц (рис. 1). Элементный анализ показал, что выявленные электронно-плотные частицы содержали в своем составе титан (рис. 2). Наночастицы разной природы имели разную морфологию: наночастицы A25 выглядели как мелкие и равномерно распределенные электронно-плотные частицы, в то время как AP75 представляли собой гранулы разного размера (рис. 2).

Наночастицы A25 и AP75 формировали агрегаты как снаружи, так и внутри клеток (рис. 3). В клетках наночастицы обнаруживали чаще всего внутри везикул (рис. 3б), что указывает на проникновение их в клетку путем эндоцитоза. Везикулы на электронно-микроскопическом уровне характеризовались разной морфологией. Часть везикул с наночастицами TiO_2 имела однородное содержимое и, по-видимому, принадлежала к компартменту ранних эндосом (рис. 3б). Другая часть везикул содержала мембранные структуры, и, вероятно, принадлежала к компартменту поздних эндосом (мультивезикулярных

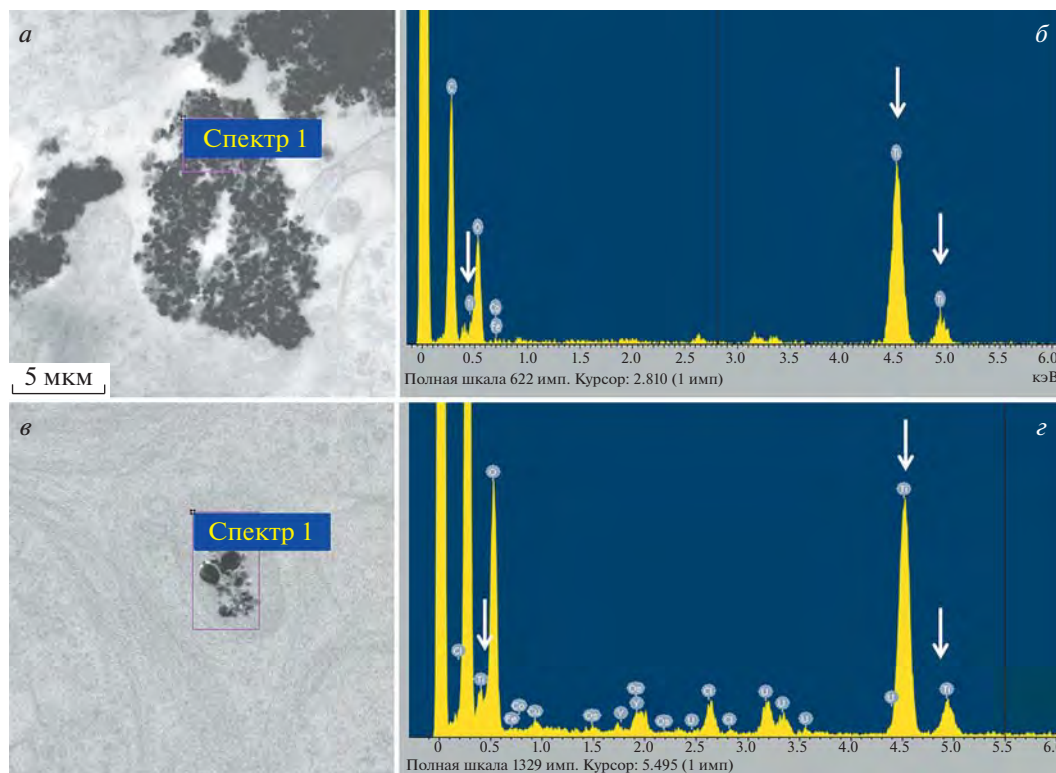


Рис. 2. Наночастицы TiO_2 (10 мкг/мл) А25 и АР75 в клетках культуры МСF-7 (элементный анализ). *а, в* — Электронно-микроскопическая фотография наночастиц TiO_2 в форме анатаза (25 нм) и анатаза с рутилом (75 нм) соответственно. *б, д* — Энергодисперсионный спектр области (спектр 1 и спектр 2 соответственно); по оси абсцисс — энергия рентгеновского излучения, кэВ, по оси ординат — интенсивность характеристического рентгеновского излучения; стрелками отмечены пики, характерные для TiO_2 , концентрация наночастиц — 10 мкг/мл.

телец) (рис. 3*з*). В некоторых случаях наночастицы располагались небольшими агрегатами свободно в цитоплазме (рис. 3*в, д, е*). Наночастицы присутствовали и в апоптотических клетках (рис. 3*д*). Кроме того, наночастицы, свободно лежащие в цитоплазме, были обнаружены в митотической клетке (рис. 3*е*).

Митотический, апоптотический и энтоотический индексы при воздействии наночастиц TiO_2 . Для оценки влияния наночастиц на культивируемые клетки МСF-7 были измерены митотический, апоптотический и энтоотический индексы на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином (рис. 4*а*). Воздействие обеих форм наночастиц TiO_2 в концентрации 10 и 100 мкг/мл вызывало уменьшение митотического индекса и увеличение апоптотического индекса по сравнению с контролем ($p \leq 0.05$ по Манну–Уитни). Апоптотический индекс в присутствии наночастиц А25, 100 мкг/мл был выше по сравнению с АР75 в той же концентрации ($p \leq 0.05$ по Манну–Уитни). Для оценки влияния наночастиц на рост культуры был проведен подсчет клеток на единицу площади (рис. 4*б*). Анализ проводили только для концентрации наночастиц 10 мкг/мл, т.к. именно в этих условиях апоптотический и митотический индексы изменяются достоверно. В контроле в течении 3-х сут

число клеток увеличивалось почти в три раза. В присутствии наночастиц (10 мкг/мл) это число возросло менее чем в два раза. Таким образом, воздействие наночастиц TiO_2 , начиная с концентрации 10 мкг/мл, вызывает уменьшение митотического индекса, возрастание апоптотического индекса и, в целом, приводит к замедлению роста культуры. Хотя TiO_2 (100 мкг/мл) образует агрегаты на поверхности клеток (рис. 5), сохраняется митотическая активность и нет значительной гибели клеток.

Энтоотический индекс при добавлении в среду культивирования наночастиц А25 и АР75 дозозависимо уменьшался по сравнению с контролем (рис. 4*а*). В присутствии 100 мкг/мл наночастиц и одного, и другого типа встречались единичные картины “клетка-в-клетке”, что указывает на подавление процесса энтоза.

Влияние наночастиц TiO_2 на прохождение энтоза в клетках МСF-7. В клетках МСF-7 в контроле процесс энтоза можно подразделить на 5 стадий (Garanina et al., 2017) (рис. 6). На первой стадии внедряющаяся клетка плотно контактирует с внешней (энтозой) клеткой. Признаки деградации внедрившейся клетки не выявляются. На второй стадии внедрившаяся клетка начинает терять контакты с мембраной энтозой ваку-

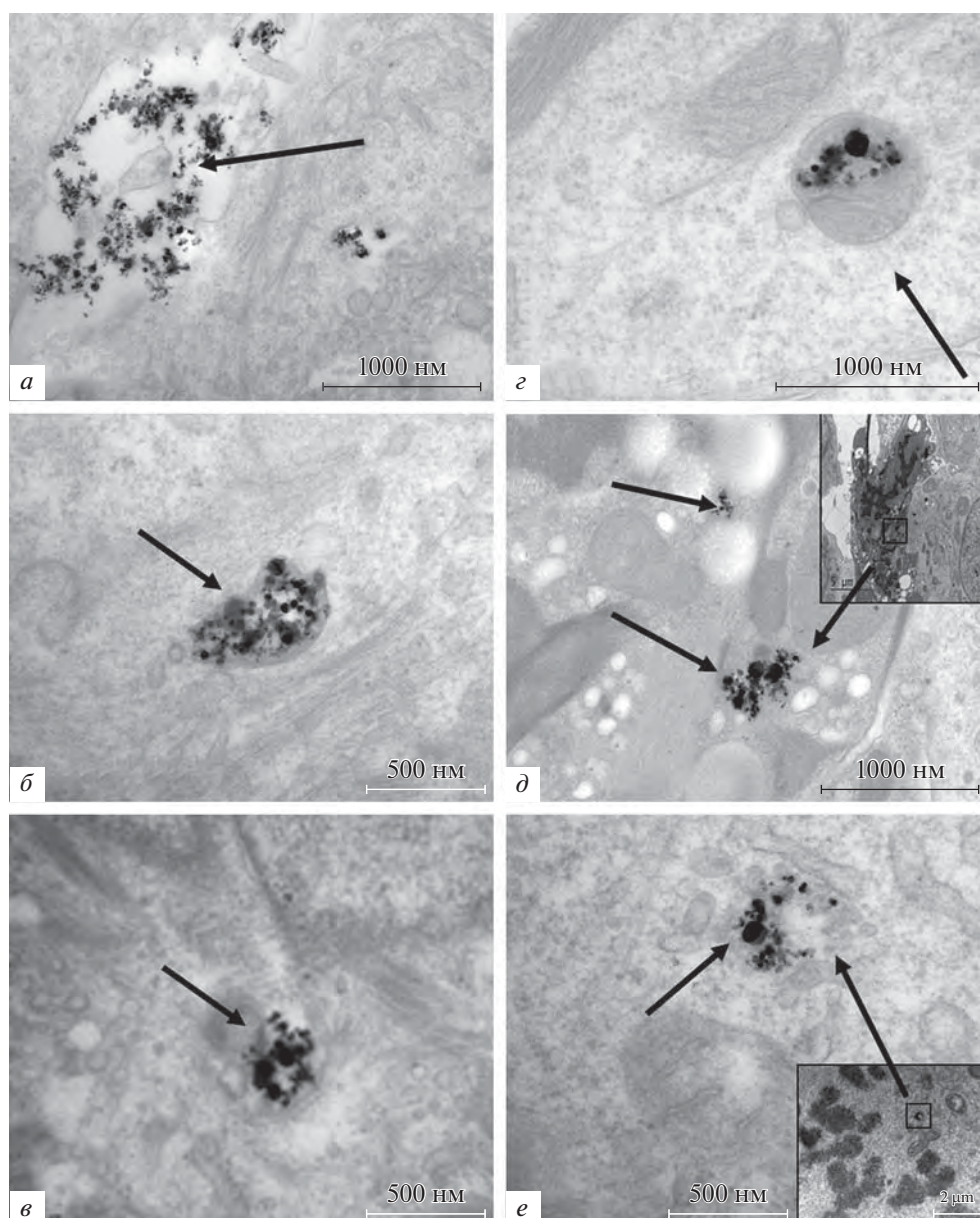


Рис. 3. Наночастицы TiO_2 в клетках культуры MCF-7, культивировавшихся 3 сут в присутствии частиц AP75 (10 мкг/мл). Трансмиссионная электронная микроскопия. Локализация наночастиц (стрелки): *a* – во внеклеточном пространстве, *б* – в ранней эндосоме, *в* – в цитоплазме, *г* – в поздней эндосоме, *д* – в цитоплазме апоптотической клетки, *е* – в цитоплазме митотической клетки; на врезках *д*, *е* представлено малое увеличение клетки.

оли. На третьей стадии свободное пространство внутри энтозной вакуоли четко выражено и внедрившаяся клетка более не имеет контактов с ее мембраной. Размер внедрившейся клетки уменьшается, хроматин начинает конденсироваться и ядро деформируется. На четвертой стадии ядро внедрившейся клетки значительно сжимается, клетка заметно уменьшается в размерах, ее содержимое деградирует. На пятой заключительной стадии внутри энтозной вакуоли выявляются полностью деградировавшие остатки внедрившейся клетки. В присутствии нано-

частиц TiO_2 морфология клеток на разных стадиях энтоза была сходна с контролем (рис. 6).

Подсчет числа энтозных клеток, находящихся на разных стадиях, показал (табл. 1), что в присутствии наночастиц TiO_2 (A25 и AP75) в концентрации 1 мкг/мл уменьшалась доля клеток на начальных этапах энтоза, что может указывать на нарушение процесса внедрения. Кроме того, увеличивалась доля клеток на III стадии, что может указывать на замедление деградации внедрившейся клетки. Необходимо отметить, что энтоз является редким событием, что дела-

ет невозможным полноценную статистическую обработку данных. При более высоких концентрациях наночастиц TiO_2 встречались единичные энтозы, что не позволило провести какой-либо анализ.

Адгезивные контакты клеток в присутствии наночастиц TiO_2 . Падение энтоического индекса и уменьшение числа энтозов на I и II стадиях может указывать на нарушение процесса внедрения. По данным из литературы известно, что для успешного внедрения необходимо формирование адгезивных контактов между клетками (Overholtzer, Brugge, 2008; Sun et al., 2014). Для выявления влияния наночастиц TiO_2 на протяженность адгезивных контактов, было проведено иммуоцитохимическое окрашивание β -катенина.

В контроле адгезивные контакты выявлялись по всей периферии контактирующих клеток и имели четкие границы (рис. 7б). В присутствии наночастиц TiO_2 изменялся характер окрашивания антителами к β -катенину. В монослое клеток присутствовали участки, в которых окрашивание либо полностью отсутствовало, либо сохранялось на небольшом протяжении межклеточной границы (рис. 7в, г). Подобные нарушения были отмечены в присутствии наночастиц как A25, так и AP75, начиная с концентрации 1 мкг/мл. Для подтверждения данных иммуоцитохимии была измерена длина адгезивных контактов. Как видно из приведенной на рис. 7а гистограммы, воздействие наночастиц TiO_2 уменьшало протяженность межклеточных контактов, при этом наночасти-

цы AP75 оказывали большее повреждающее действие, чем наночастицы A25 при тех же концентрациях.

Анализ протяженности адгезивных контактов на I и II стадиях энтоза показал нарушение их формирования (рис. 7в, г, врезки) в присутствии наночастиц TiO_2 , в то время как в контроле адгезивные контакты на начальных стадиях энтоза выявляются на всем протяжении энтозной вакуоли (рис. 7б, врезка).

Распределение белка p53 при воздействии наночастиц TiO_2 в клетках MCF-7. Белок p53 является одним из основных регуляторов клеточного цикла. При различных повреждениях клеток он перемещается в ядро и работает в качестве фактора транскрипции генов, вызывающих остановку клеточного цикла и активацию либо систем репарации, либо апоптотической гибели клетки (Чумаков, 2007). Так как воздействие наночастиц TiO_2 вызывало уменьшение митотического индекса и возрастание апоптотического индекса, мы проанализировали распределение p53 в контроле и в присутствии наночастиц TiO_2 .

Имуоцитохимическое окрашивание в контроле выявило небольшое количество слабо-флуоресцирующих ядер клеток (рис. 8б). При воздействии наночастиц A25 (10 мкг/мл) наблюдали увеличение доли ярко флуоресцирующих ядер (рис. 8в). В присутствии наночастиц AP75 (10 мкг/мл) картина распределения и интенсивности флуоресценции была сходна с контролем (рис. 8г).

Измерение интенсивности флуоресценции ядер клеток показало, что в контроле чаще встречались

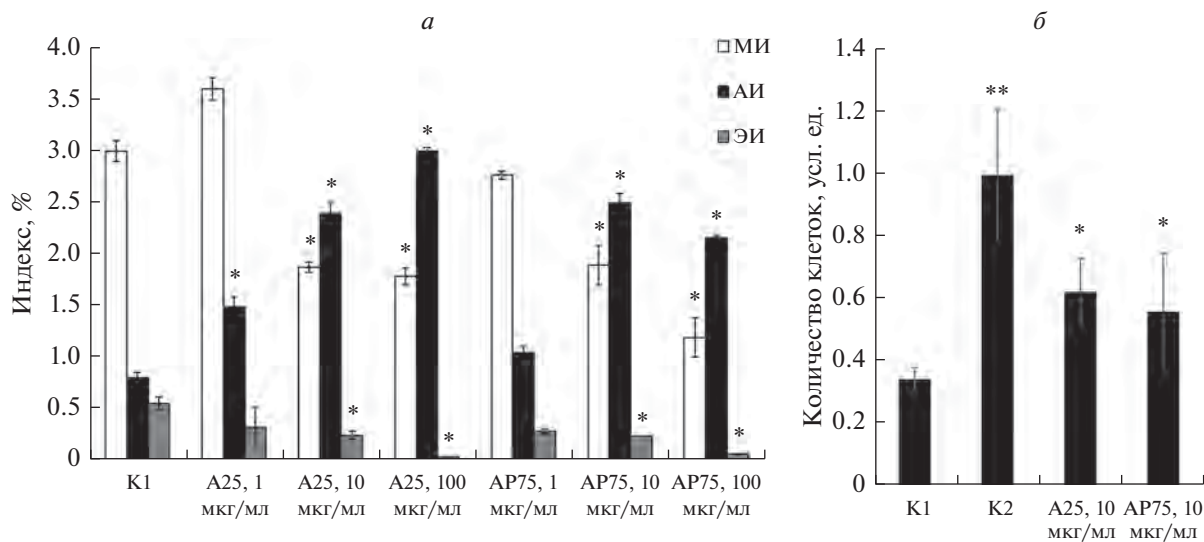


Рис. 4. Влияние наночастиц TiO_2 в разной концентрации в течении 3 сут на пролиферативную активность, выживаемость и энтоз клеток MCF-7. *а* — Изменение митотического (МИ), апоптотического (АИ) и энтоического (ЭИ) индексов в клетках; A25 — наночастицы анатаза размером 25 нм, AP75 — смесь наночастиц анатаза и рутила размером 75 нм; (*) — различия относительно K1 достоверны при $p \leq 0.05$ (критерий Манн–Уитни); *б* — изменение числа клеток при культивировании в присутствии наночастиц TiO_2 (10 мкг/мл); K1 и K2 — количество клеток через 24 ч культивирования перед добавлением наночастиц и через 3 сут культивирования соответственно; по вертикали указано количество клеток в усл. ед. относительно K2; (*) — различия относительно K1 достоверны при $p \leq 0.05$ (критерий Манн–Уитни); (**) — различия относительно K1 и эксперимента достоверны при $p \leq 0.05$ (критерий Манн–Уитни); указаны значения среднего и его ошибки ($n = 3$).

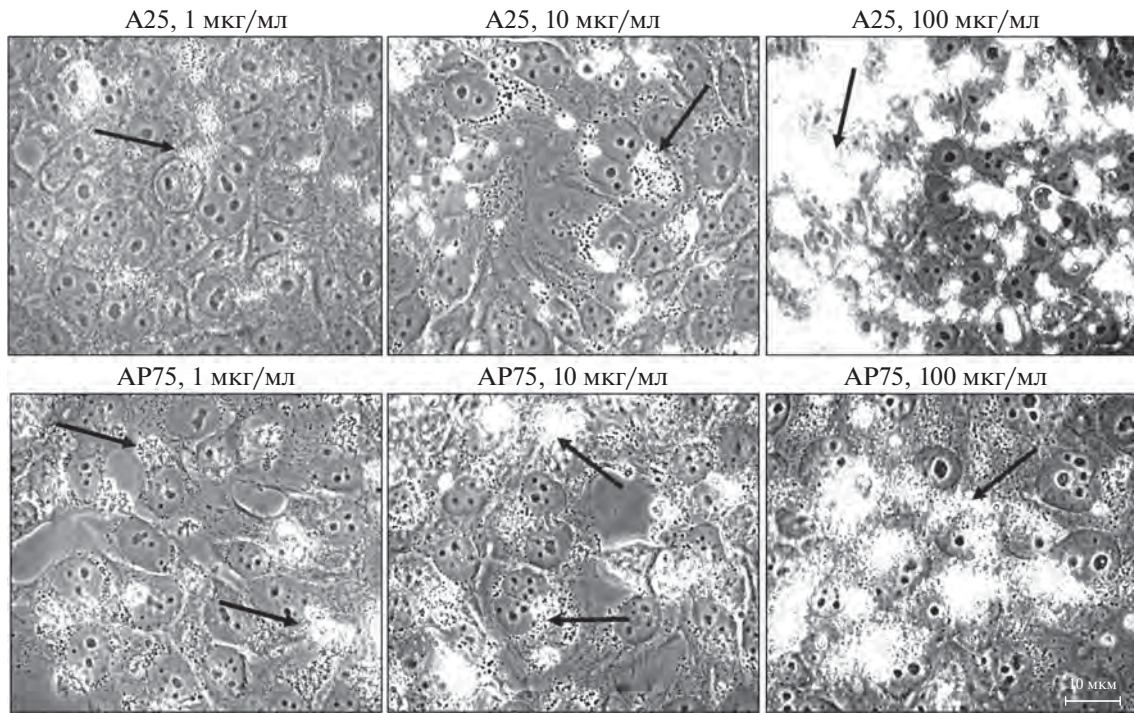


Рис. 5. Общий вид клеток MCF7 в присутствии наночастиц TiO_2 (A25 и AP75) в разных концентрациях. Фазовый контраст. Стрелки указывают на агрегаты наночастиц. Масштабный отрезок: 10 мкм.

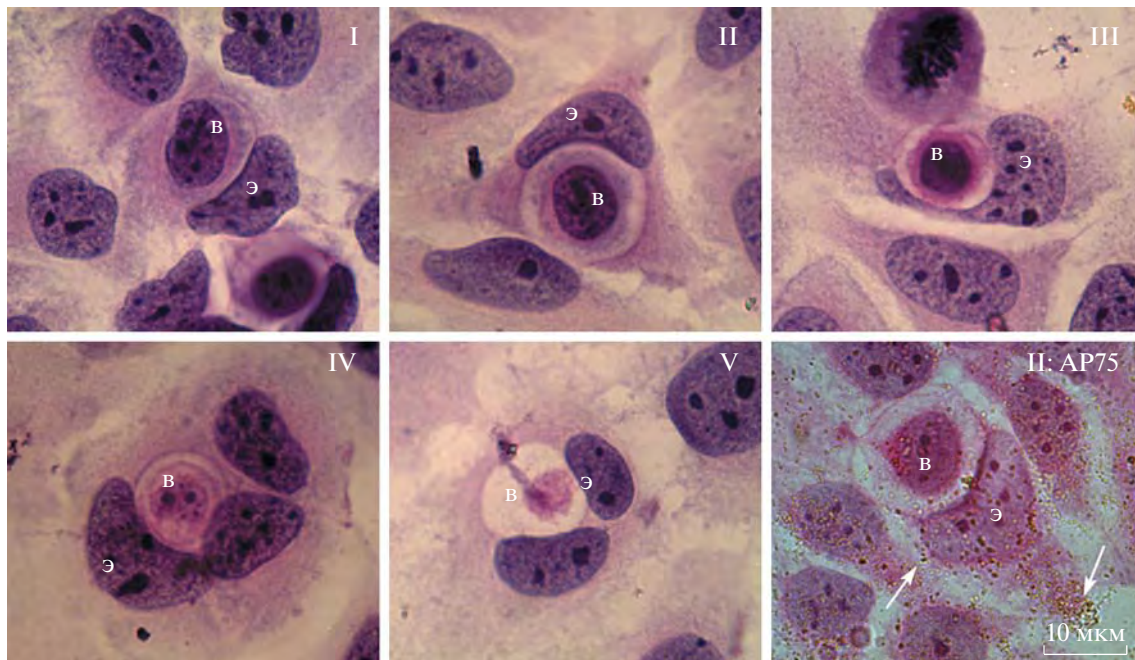


Рис. 6. Стадии энтоза I–V в контрольных клетках MCF-7 и в присутствии 10 мкг/мл AP75 на стадии II (II: AP75). Световая микроскопия, окрашивание гематоксилином и эозином. Э – энтозная клетка, В – внедрившаяся клетка. Стрелка указывает на наночастицы.

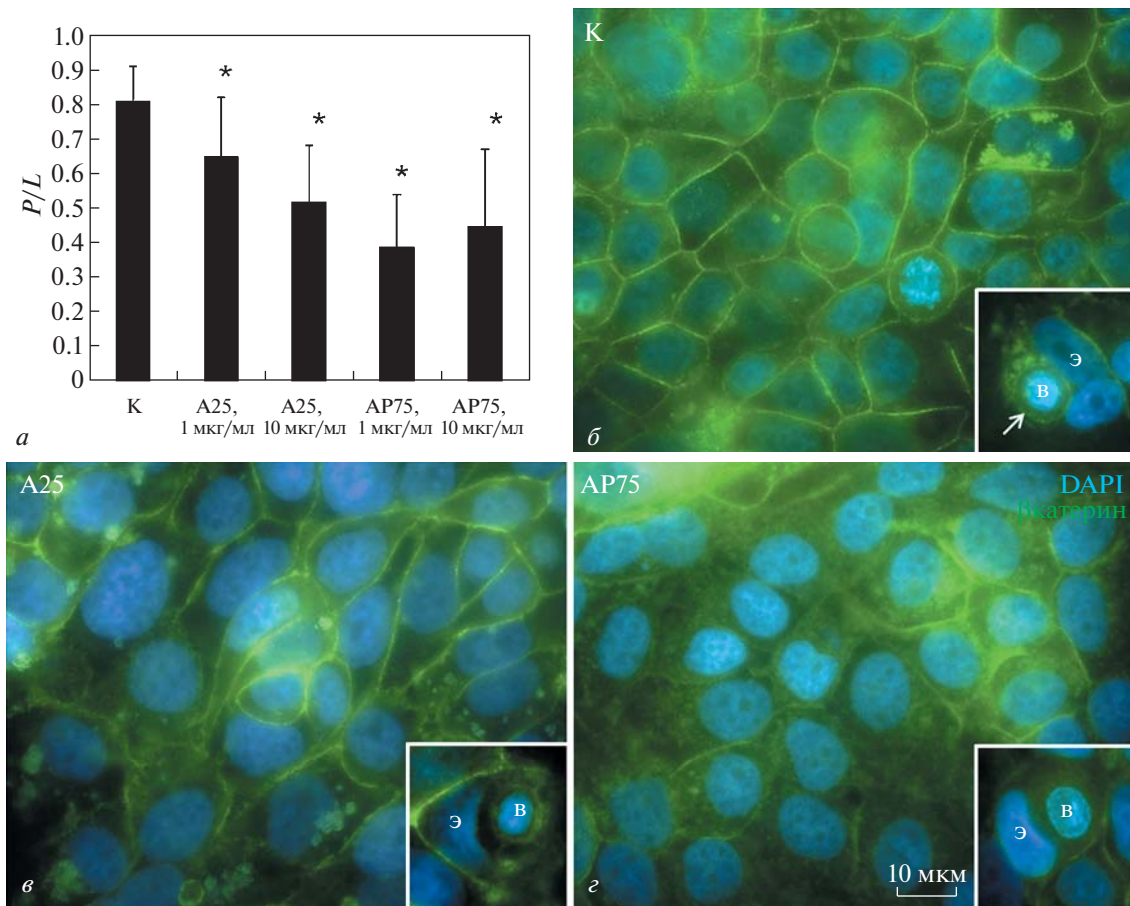


Рис. 7. Адгезивные контакты клеток МСF-7 в присутствии 10 мкг/мл наночастиц TiO_2 (A25 или AP75). *a* – Изменение протяженности адгезивных контактов клеток при воздействии наночастиц в разной концентрации; по оси ординат – отношение протяженности P периметра клетки к протяженности межклеточного контакта L (P/L); указаны среднее значение и стандартное отклонение выборки ($n = 90$ и $n = 50$ соответственно в контроле и эксперименте); (*) – различия относительно контроля достоверны при $p \leq 0.05$ (по t -критерию Стьюдента). *б, в, г* – Иммуноцитохимическое выявление β -катенина (зеленый сигнал); энтозы представлены в отдельных врезках, Э – энтозная клетка, В – внедрившаяся клетка, стрелка указывает на адгезивный контакт между энтозной и внедрившейся клетками; *б* – контроль, *в, г* – воздействие 10 мкг/мл наночастиц TiO_2 (A25 или AP75), ядра клеток докрашены DAPI (синий сигнал).

Таблица 1. Частота встречаемости различных стадий энтоза в клетках МСF-7 в контроле и в присутствии 1 мкг/мл наночастиц TiO_2 (A25 и AP75) в течение 3 сут

Воздействие наночастиц	Доля клеток на стадии энтоза, %				
	I	II	III	IV	V
Нет, контроль ($n = 100$)	12	25	36	14	13
A25 ($n = 68$)	1.5	12	54.5	15	18
AP75 ($n = 86$)	3.5	10.5	50	22	14

Примечание. n – число проанализированных энтозов (100%); жирным шрифтом выделены наиболее часто встречающиеся стадии энтоза.

слабо-флуоресцирующие ядра (рис. 8*a*). В присутствии AP75 увеличивалась доля слабо-флуоресцирующих ядер. В то же время при воздействии наночастиц A25 в концентрации 1 и 10 мкг/мл было обнаружено значительное увеличение доли ярко- и средне-флуоресцирующих ядер по сравнению с контролем ($p \leq 0.05$ по t -критерию). Таким образом, только наночастицы A25 вызывают перемещение фактора транскрипции p53 в ядра клеток, что может приводить к остановке клеточного цикла и активации программы апоптоза.

В процессе энтоза p53 обнаруживается как в ядрах энтозных клеток, так и в ядрах внедрившихся клеток. В контроле меньше половины ядер энтозных клеток содержали p53 (12 из 34). Среди ядер внедрившихся клеток (на I, II и III стадиях), наоборот, преобладали p53-содержащие (16 из 25). В присутствии титановых наночастиц встречаются p53 положительные ядра как энтозных, так и внедрившихся

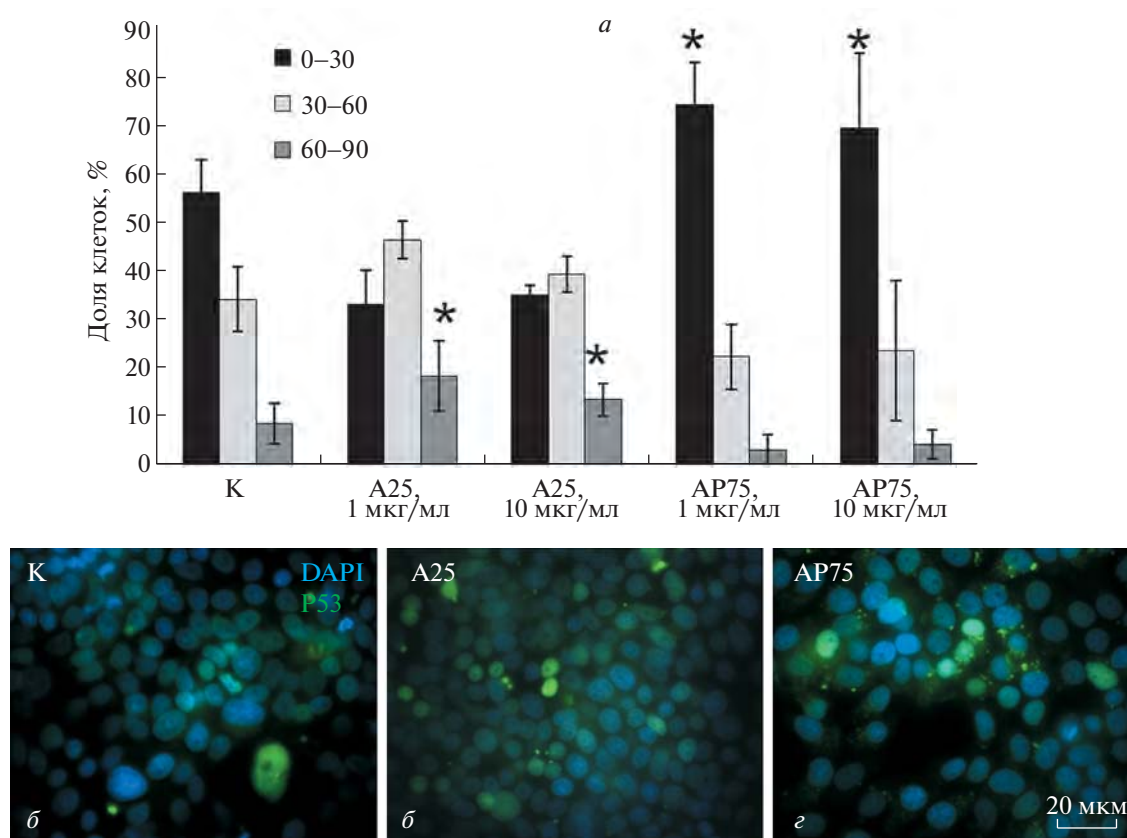


Рис. 8. Распределение белка p53 в ядрах клеток MCF-7 в контроле (К) и в присутствии 10 мкг/мл наночастиц TiO₂ (A25 и AP75). *a* – Распределение клеток по интенсивности флуоресценции (ИФ, усл. ед.) антител против белка p53; показаны три группы клеток с ИФ 0–30, 30–60 и 60–90; указаны среднее значение и стандартное отклонение выборки; (*) – различие с К достоверно при $p \leq 0.05$ (*t*-критерий Стьюдента). *б, в, з* – Иммуноцитохимическое выявление белка p53 (зеленый цвет) в клетках MCF-7, ядра клеток докрашены DAPI (синий сигнал).

клеток. В связи с небольшим количеством проанализированных клеток выделить какую-либо закономерность распределения p53 не представляется возможным (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенная работа показала, что в присутствии наночастиц TiO₂ в культуре клеток MCF7 происходит незначительное увеличение апоптотического индекса и падение митотического индекса. Начиная с концентрации 10 мкг/мл, апоптотический индекс превышает митотический, что приводит к замедлению роста культуры. Увеличение апоптотического индекса может быть опосредовано выходом поглощенных клеткой наночастиц из везикул эндосомного компартмента в цитозоль. Электронно-микроскопические данные подтверждает наличие наночастиц в цитозоле. Выход из эндосомного компартмента по данным из литературы может быть связан со способностью наночастиц TiO₂ окислять липиды и нарушать целостность мембран (Sydor et al., 2020). По другим данным наночастицы TiO₂ увеличивают pH внутри ли-

Таблица 2. Наличие белка p53 в ядрах энтозных (Э) и внедрившихся (В) клеток в присутствии наночастиц TiO₂

Наночастицы TiO ₂	Э-клетки (I и II стадии)		В-клетки	
	p53 ⁺	p53 ⁻	p53 ⁺	p53 ⁻
Нет, контроль (n = 34)	12	22	16	9
A25, 1 мкг/мл (n = 5)	4	1	3	1
A25, 10 мкг/мл (n = 5)	2	3	2	2
AP75, 1 мкг/мл (n = 9)	1	8	0	4
AP75, 10 мкг/мл (n = 5)	0	4	3	1

Примечание. *n* – Число проанализированных клеток; p53⁺ и p53⁻ – соответственно p53, содержащийся и не содержащийся в ядрах.

зосомы, что приводит к разрыву мембраны в результате осмотического набухания лизосом (Frohlich, 2013). В дальнейшем такие наночастицы могут перемещаться в ядро, где они оказывают повреждающее воздействие на ДНК (Sayes et al., 2006).

Мы предполагаем, что свободно лежащие наночастицы, выявляемые нами на электронно-микроскопических изображениях, могут быть случайно захвачены в состав ядра при формировании ядерной оболочки в процессе митоза, или пассивно проходить через ядерные поры. Наночастицы анатаза обладают меньшими размерами (<25 нм) по сравнению с наночастицами анатаз-рутил (<75 нм), облегчающими их проникновение через ядерную пору, что может объяснять больший апоптотический индекс, наблюдаемый в нашем исследовании. Кроме того, перемещение p53 в ядра клеток также наблюдается именно в присутствии наночастиц анатаза.

В ядре p53 может активировать транскрипцию проапоптотических генов, вызывая увеличение апоптотического индекса, или генов ингибиторов клеточного цикла, что приводит к падению митотического индекса (Чумаков, 2007). Более крупные наночастицы AP75 возможно не способны проникать через ядерную пору и повреждать ДНК, поэтому мы не наблюдаем перемещения p53 в ядро. Тем не менее, в присутствии этих наночастиц также происходит увеличение апоптотического индекса и падение митотического индекса. Возможно, механизм активации апоптоза и замедления клеточного цикла в данном случае не связаны с работой p53. В целом первая часть работы показала, что частицы A25 обладают большей повреждающей способностью, чем AP75. Повышенное (по сравнению с контролем) накопление p53 в ядрах клеток при воздействии анатазных наночастиц может являться механизмом активации клеточной гибели.

Воздействие наночастиц TiO₂, как A25, так и AP75, приводит к значительному уменьшению числа энтозов в клетках MCF-7. Наиболее вероятной причиной является нарушение начальных этапов внедрения клеток, о чем свидетельствует уменьшение числа энтозов, находящихся на I стадии. В литературе имеются данные, что наночастицы TiO₂ связываются с внеклеточными доменами кадгеринов, вследствие чего кадгеринины удаляются с мембраны путем эндоцитоза (Setyawati et al., 2013), и адгезивные контакты разрушаются. Таким образом, внедряющаяся клетка оказывается неспособной взаимодействовать с энтозной клеткой. Однако если рассматривать действие наночастиц TiO₂ на опухолевую ткань в целом, то повреждение адгезивных контактов может приводить к нарушению контактов между клетками, усилению их подвижности и росту метастазирования.

Уменьшение числа энтозов может быть также связано с падением митотического индекса. Показано, что клетки, закончившие митоз, обладают повышенной способностью к внедрению (Кисурина-Ев-

геньева и др., 2018; Durgan et al., 2018). Так как TiO₂ снижает митотическую активность клеток, число таких событий уменьшается.

Увеличение содержания в популяции энтозов на III стадии может указывать на замедление деградации внедрившейся клетки в присутствии наночастиц TiO₂. Длительное сохранение энтозной вакуоли увеличивает вероятность вступления наружной клетки в митоз, проходящий с нарушением цитокинеза и заканчивающийся образованием полиплоидной клетки (Krajcovic et al., 2011). Снижение митотической активности в присутствии TiO₂ может нивелировать этот эффект. При этом важную роль может играть p53, регулирующий прохождение клеток по клеточному циклу. Ранее нами было показано, что в культуре клеток MCF-7 фактор p53 обнаруживается чаще в ядрах энтозных и внедрившихся клеток, чем в культуре в целом. При этом позитивно окрашены были ядра у 26% энтозных клеток и у 22% внедрившихся клеток (Кисурина и др., 2018). В настоящей работе в контроле p53 чаще выявлялся в ядрах внедрившихся клеток, чем в ядрах энтозных клеток. Повышенная частота встречаемости p53-положительных ядер среди внедрившихся клеток может быть связана с тем, что (по последним данным из литературы) клетки с повреждениями ДНК чаще внедряются, инициируя процесс энтоза (Liang et al., 2021). В присутствии A25, по сравнению с AP75, чаще встречаются p53-положительные ядра как среди энтозных, так и среди внедрившихся клеток, что может указывать на повреждающий эффект этих наночастиц.

Таким образом, можно заключить, что воздействие наночастиц TiO₂ на культуру опухолевых клеток молочной железы приводит к подавлению энтоза. Так как наличие энтозов может приводить к полиплоидизации клеток (Krajcovic et al., 2011), наночастицы TiO₂ оказывают положительное влияние на генетическую стабильность в популяции. Кроме того, в присутствии наночастиц TiO₂, замедляется пролиферация опухолевых клеток. В целом, полученные результаты демонстрируют, что наночастицы TiO₂ могут быть использованы в адресной доставке химиотерапевтических препаратов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет бюджетных средств Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по плановой теме “Механизмы выживания и гибели клеток” (121032300098-5).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не включала экспериментов с участием животных или людей.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кисурина-Евгеньева О.П., Хашба Л.А., Савицкая М.А., Онищенко Г.Е.* 2018. Энтоз и клеточный цикл в культуре опухолевых клеток. Цитология. Т. 60. № 9. С. 693. (*Kisurina-Evgenieva O.P., Khashba L.A., Mamichev I.A., Savitskaya M.A., Onishchenko G.E.* 2019. Entosis and cell cycle in tumor cell culture. *Cell. Tissue Biol.* V. 13. P. 8.). <https://doi.org/10.1134/S1990519X19010073>
- Чумаков П.М.* 2007. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биол. химии. Т. 47. С. 3. (*Chumakov P. M.* 2007. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry (Mosc).* V. 72. № 13. P.1399.) <https://doi.org/10.1134/s0006297907130019>
- Biola-Clier M., Gaillard J.-C., Rabilloud T., Armengaud J., Carriere M.* 2020. Titanium dioxide nanoparticles alter the cellular phosphoproteome in A549 cells. *Nanomaterials.* V. 10. P. 185. <https://doi.org/10.3390/nano10020185>
- Ding L., Li J., Huang R., Liu Z., Li C., Yao S., Wang J., Qi D., Li N., Pi J.* 2016. Salvianolic acid B protects against myocardial damage caused by nanocarrier TiO₂; and synergistic anti-breast carcinoma effect with curcumin via codelivery system of folic acid-targeted and polyethylene glycol-modified TiO₂ nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine.* V. 11. P. 5709. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107767>
- Durgan J., Tseng Y.Y., Hamann J.C., Domart M.C., Collinson L., Hall A., Overholtzer M., Florey O.* 2017. Mitosis can drive cell cannibalism through entosis. *Elife.* V. 6. P. e27134. <https://doi.org/10.7554/eLife.27134>
- Fage S.W., Muris J., Jakobsen S. S., Thyssen J.P.* 2016. Titanium: a review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. *Contact Dermatitis.* V. 74. P. 323. <https://doi.org/10.1111/cod.12565>
- Frohlich E.* 2013. Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. *Curr. Drug Metab.* V. 14. P. 976. <https://doi.org/10.2174/1389200211314090004>
- Garanina A.S., Kisurina-Evgenieva O.P., Erokhina M.V., Smirnova E.A., Factor V.M., Onishchenko G.E.* 2017. Consecutive entosis stages in human substrate-dependent cultured cells. *Sci. Rep.* V. 7. P. 12555. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12867-6>
- Hanot-Roy M., Tubeuf E., Guilbert A., Bado-Nilles A., Vigneron P., Trouiller B., Braun A., Lacroix G.* 2016. Oxidative stress pathways involved in cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on cells constitutive of alveolo-capillary barrier *in vitro*. *Toxicol. In Vitro.* V. 33. P. 125. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.013>
- Hurum D.C., Gray K.A., Rajh T., Thurnauer M.C.* 2005. Recombination pathways in the degussa P25 formulation of TiO₂: surface versus lattice mechanisms. *J. Phys. Chem.* V. 109. P. 977. <https://doi.org/10.1021/jp045395d>
- Krajcovic M., Johnson N.B., Sun Q., Normand G., Hoover N., Yao E., Richardson A.L., King R.W., Cibas E.S., Schnitt S.J., Brugge J.S., Overholtzer M.* 2011. A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. *Nat. Cell Biol.* V. 13. P. 324. <https://doi.org/10.1038/ncb2174>
- Krishna S., Overholtzer M.* 2016. Mechanisms and consequences of entosis. *Cell Mol. Life Sci.* V. 73. P. 2379. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2207-0>
- Lagopati N., Tsilibary E.-P., Falaras P., Papazafiri P., Pavlatou E.A., Kotsopoulou E., Kitsiou I P.* 2014. Effect of nanostructured TiO₂ crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells. *Int. J. Nanomedicine.* V. 9. P. 3219. <https://doi.org/10.2147/IJN.S62972>
- Liang J., Niu Z., Zhang B., Yu X., Zheng Y., Wang C., Ren H., Wang M., Ruan B., Qin H., Zhang X., Gu S., Sai X., Tai Y., Gao L., et al.* 2021. p53-dependent elimination of aneuploid mitotic offspring by entosis. *Cell Death. Differ.* V. 28. P. 799. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00645-3>
- Overholtzer M., Brugge J.S.* 2008. The cell biology of cell-in-cell structures. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* V. 9. P. 796. <https://doi.org/10.1038/nrm2504>
- Overholtzer M., Mailleux A.A., Mouneimne G., Normand G., Schnitt S.J., King R.W., Cibas E.S., Brugge J.S.* 2007. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell.* V. 131. P. 966. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.040>
- Rossi E.M., Pyllkänen L., Koivisto A.J., Vippola M., Jensen K.A., Miettinen M., Sirola K., Nykäsenoja H., Karisola P., Stjernvall T., Vanhala E., Kiilunen M., Pasanen P., Mäkinen M., Hämeri K., et al.* 2010. Airway exposure to silica-coated TiO₂ nanoparticles induces pulmonary neutrophilia in mice. *Toxicol. Sci.* V. 113. P. 422. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp254>
- Sayes C.M., Wahi R., Kurian P.A., Liu Y., West J.L., Ausman K.D., Warheit D.B., Colvin V.L.* 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.* V. 92. P. 174. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFJ197>
- Sayes C.M., Wahi R., Kurian P.A., Liu Y., West J.L., Ausman K.D., Warheit D.B., Colvin V.L.* 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.* V. 92. P. 174. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj197>
- Setyawati M.I., Tay C.Y., Chia S.L., Goh S.L., Fang W., Neo M.J., Chong H.C., Tan S. M., Loo S. C.J., Ng K.W., Xie J.P., Ong C.N., Tan N.S., Leong D.T.* 2013. Titanium dioxide nanomaterials cause endothelial cell leakiness by disrupting the homophilic interaction of VE-cadherin. *Nat. Commun.* V. 4. P. 1673. <https://doi.org/10.1038/ncomms2655>
- Sun Q., Cibas E.S., Huang H., Hodgson L., Overholtzer M.* 2014. Induction of entosis by epithelial cadherin expression. *Cell Res.* V. 24. P. 1288. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.137>
- Sund J., Palomäki J., Ahonen N., Savolainen K., Alenius H., Puustinen A.* 2014. Phagocytosis of nano-sized titanium dioxide triggers changes in protein acetylation. *J. Proteomics.* V. 108. P. 469. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.011>
- Sydor M.J., Anderson D.S., Steele H.B.B., Ross J.B.A., Holian A.* 2020. Effects of titanium dioxide and zinc oxide nano-

- terials on lipid order in model membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* V. 1862. P. 183313.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183313>
- Trang N.T.K., Dong V.P., Hoon Y. 2021. Cellular effects of ultraviolet-radiated reduced-titanium dioxide nanoparticles on human hypopharyngeal adenocarcinoma cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* V. 21. P. 3656.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2021.19172>
- Wang J., Zhou G., Chen C., Yu H., Wang T., Ma Y., Jia C., Gao Y., Li B., Sun J., Li Y., Fang Jiao, Zhao Y., Chai Z. 2007. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol. Lett.* V. 168. P. 176.
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.12.001>
- Wang Y., Cui H., Zhou J., Li F., Wang J., Chen M., Liu Q. 2015. Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* V. 22. P. 5519.
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3717-7>
- Warheit D.B., Webb T.R., Sayes C.M., Colvin V.L., Reed K.L. 2006. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicol. Sci.* V. 91. P. 227.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj140>
- Zeng L., Pan Y., Tian Y., Wang X., Ren W., Wang S., Lu G., Wu A. 2015. Doxorubicin-loaded NaYF₄: Yb/Tm–TiO₂ inorganic photosensitizers for NIR-triggered photodynamic therapy and enhanced chemotherapy in drug-resistant breast cancers. *Biomaterials.* V. 57. P. 93.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.006>

Titanium Dioxide Nanoparticles Inhibits Entosis in the Human Breast Adenocarcinoma Cell Line

O. P. Kisurina-Evgenieva^{a, *}, M. A. Savitskaya^a, D. S. Smeshnova^a, and G. E. Onishchenko^a

^aFaculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: evgengeva@mail.ru

TiO₂ is widely used in industry and cosmetics and medicines production. In recent years, to achieve tumor-specific delivery of anticancer agents, TiO₂ nanoparticles have been used in chemo/photodynamic therapy, which may cause local increase of the TiO₂ concentration in tumors. The TiO₂ nanoparticles can affect various processes in tumors. One of such process is entosis. During entosis one tumor cell invades another tumor cell. The aim of this work was to study the effect of TiO₂ nanoparticles (anatase <25 nm and rutil/anatase <75 nm; 1, 10 and 100 µg/mL, 72 hours) on the entosis in the human breast adenocarcinoma cell line (MCF7). Cultivation of cells in the presence of nanoparticles lead to a slowdown in proliferation and reduced in the entosis number. These effects were dose-dependent. Elemental analysis (analytical electron microscopy) showed presence TiO₂ nanoparticles in the cell vacuoles, in the cytosol and in the extracellular space. TiO₂ nanoparticles (10 µg/mL) significantly disrupted adhesive junctions in entotic cells and in cell culture in general (immunocytochemistry staining). The anatase nanoparticles induced p53 translocation into the nucleus. Thus, the obtained data showed that the TiO₂ nanoparticles inhibited entosis in MCF-7 cells by means of disrupting the adhesive junction formation and preventing cell invasion. However, failure of adhesive contacts can facilitate tumor metastasis.

Keywords: adherens junctions, nanoparticles, titanium dioxide, p53, entosis