

УДК 616-006.04:574:577.121:577.125.53

Слейко Л.О., Михайленко В.М. (Україна, Київ)

ЗМІНИ ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ ТА ФОСФОЛІПІДНОГО ПРОФІЛЮ ПРИ ДІЇ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОЧАСТИНОК

Виробництво вуглецевих наночастинок (ВНЧ) займає перше місце серед усіх наноматеріалів. Протягом 2008-2010 рр. у виробництво вуглецевих наночастинок планувалося вкладати 3,6 млрд. доларів США на рік. Однак, унікальні характеристики НЧ, які обумовлюють перспективність їх використання в промисловості, медицині і побуті, є потенційним джерелом небезпеки для живих організмів. Основні небезпеки від застосування наночастинок пов'язані із нанорозмірними особливостями, зокрема, великою площею поверхні і посиленою хімічною реактивністю, та недостатньо вивченим впливом на живі організми і екосистеми [1].

Дані, отримані в експериментальних та епідеміологічних дослідженнях, щодо впливу нанорозмірних забруднювачів повітря (пилу, мінеральних частинок та волокон), свідчать про високу ймовірність токсичної та/або канцерогенної дії новостворених НЧ [2, 3]. Їх медичне застосування та поширення у побуті і на робочому місці в комбінації з іншими шкідливими факторами може мати непередбачувані негативні наслідки для здоров'я, зокрема, підвищувати ризик розвитку онкологічних захворювань. Науковці звертають увагу на те, що нанорозмірний діаметр вуглецевих нанотрубок та їхня голкоподібна форма роблять їх схожими на волокна азбесту, інгаляційне надходження яких призводить до виникнення раку легень [4].

НЧ можуть потрапляти в організм людини інгаляційним шляхом, через шкіру, а також через шлунково-кишковий тракт. Переміщення НЧ з легенів у кров та інші органи було показано для різних НЧ, що спричиняє системний вплив на здоров'я [4, 5].

На сьогодні залишається не вирішеною проблема оцінки токсичних ефектів НЧ наявними методами. Більшість дослідників сходиться на думці про необхідність перегляду традиційних батарей тестів, проте не розроблено чітких критеріїв для оцінки ризиків дії НЧ на живі системи.

Метою нашої роботи було встановлення впливу вуглецевих НЧ на енергетичний метаболізм, фосфоліпідний профіль та рівень мобільних ліпідних доменів у клітинах асцитної карциноми Ерліха (АКЕ).

У дослідженнях вивчали дію вуглецевих НЧ двох типів – фулеренів C_{60} ("Sigma", США) та багаточарових вуглецевих нанотрубок (БШВНТ) (люб'язно наданих Семеновим Г.І. та Алексеевою Т.А., ВАТ «Спецмаш», Київ, Україна). Для проведення досліджень використовували білих нелінійних самців мишей масою 19-22 г з віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького, НАН України (ІЕПОР). Всі процедури з тваринами проводили відповідно до вимог Державного комітету з етики. Культура АКЕ була отримана в банку клітинних ліній ІЕПОР та підтримувалася шляхом інтраперитонеальних перещеплень мишам. Проводили *in vitro* (з фулеренами C_{60}) та *in vivo* (з БШВНТ) дослідження. Клітини АКЕ ($7 \cdot 10^5$ кл/мл поживного середовища) інкубували з фулеренами C_{60} в концентрації 0,07 мг/мл протягом 1 доби. БШВНТ вводили у черевну порожнину мишей на 1 добу в концентраціях 0.5 та 1.5 мг/миша на 6-ту добу після перещеплення пухлини.

Для оцінки впливу вуглецевих НЧ на біоенергетичний статус клітин використовували 1H та ^{31}P ЯМР спектроскопію. Метод ^{31}P ЯМР спектроскопії дозволяє одночасно провести оцінку рівня основних високоенергетичних фосфоровмісних сполук клітини. У легенях, печінці та пухлинній тканині щурів визначали вміст нуклеозидтрифосфатів (НТФ), нуклеозиддифосфатів (НДФ), неорганічного фосфату (НФ), фосфокреатину (ФК), фосфохоліну (ФХ), фосфоетаноламіну (ФЕ), гліцерофосфохоліну (ГФХ), гліцерофосфоетаноламіну (ГФЕ), дифосфодиефірів (ДФДЕ), нікотинаміддинуклеотидфосфату (НАДФ(Н)), уридиндифосфату (УДФ) та органічних фосфатів (ОФ) (рисунок 1). ФЕ і ФХ – належать до фосфомоноєфірів (ФМЕ), що є субстратами для синтезу складових мембран. ГФЕ і ГФХ – належать до фосфодиефірів (ФДЕ), що є продуктами розпаду мембран. Відносний вміст таурину, лактату, холіну+фосфохоліну+гліцерофосфохоліну (Хол+ФХ+ГФХ) та креатину+креатинфосфату (Кр+ФКр) визначали за допомогою 1H ЯМР спектроскопії.

Методом ^{31}P -ЯМР спектроскопії визначали вміст наступних фосфоліпідів у клітинах АКЕ: фосфатидилхоліну (ФТХ), плазмалогену фосфатидилхоліну (ПФТХ), фосфатидилетаноламіну (ФТЕА),

плазмалогену фосфатидилетаноламіну (ПФТЕА), фосфатидилсерину (ФТС), кардіоліпіну та фосфатидилінозиту (ФТІ). Ступінь структуризації мембран оцінювали за співвідношенням ФТХ/СМ.

Метод протонного ЯМР дозволяє реєструвати зміну інтенсивності сигналів метиленового ($(-\text{CH}_2-)_n$ при 1,3 м.д.) та метильного (CH_3 при 0,9 м.д.) резонансу протонів, які входять до складу мобільних ліпідних доменів (МЛД) з молекулами, що мають достатню молекулярну рухливість, а також протонів, які входять до складу $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ груп холіну, при 3,2 м.д. Природа резонансів пов'язана з особливостями обміну ліпідів в клітині, а також змінами складу та текучості клітинної мембрани [6]. Для оцінки рівня МЛД в клітинах розраховували співвідношення інтегральних величин метиленового та метилового сигналів (CH_2/CH_3), а також визначали загальний рівень холіну в клітинах.

Оцінка вмісту різних фосфоровмісних метаболітів дозволяє визначити ряд характерних параметрів метаболізму клітин. Біоенергетичний статус клітин оцінювали за наступними співвідношеннями: НФ/βНТФ, ФМЕ/βНТФ, НФ/ФМЕ. Зростання співвідношення НФ/βНТФ свідчить про погіршення енергетичного обміну, відображає зниження рівня високоенергетичних сполук в клітинах. Зростання співвідношень ФМЕ/βНТФ та НФ/ФМЕ відображає посилення гіпоксії клітин [7]. Рівень обміну компонентів мембран оцінювали за співвідношенням ФМЕ/ФДЕ, зростання якого свідчить про активацію процесів синтезу складових мембран [8, 9, 10].

Інкубування клітин АКЕ з фулеренами C_{60} супроводжувалося активацією енергетичного метаболізму та зниженням рівня гіпоксії, що проявлялося у зменшенні величини співвідношення НФ/ФМЕ на 70%. Експозиція до фулеренів C_{60} спричиняла зниження співвідношення ФМЕ/ФДЕ та 25%, що свідчить про спад синтезу компонентів мембран (рисунок 1В).

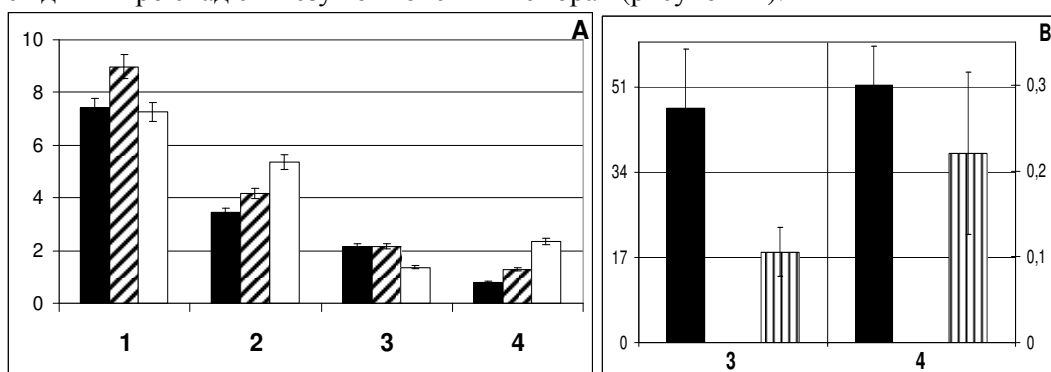


Рисунок 1 – Рівень енергетичного метаболізму в клітинах АКЕ, інкубованих з ВНЧ. (А) Вплив БШВНТ на співвідношення НФ/βНТФ, ФМЕ/βНТФ, НФ/ФМЕ, ФМЕ/ФДЕ у клітинах АКЕ: ■ – контрольні клітини; ▨ – клітини, інкубовані з БШВНТ (0.5 мг/миша); □ – клітини, інкубовані з БШВНТ (1.5 мг/миша). (В) Вплив фулеренів C_{60} на співвідношення НФ/βНТФ, ФМЕ/βНТФ, НФ/ФМЕ, ФМЕ/ФДЕ у клітинах АКЕ: ■ – контрольні клітини; ▨ – клітини, інкубовані з фулеренами C_{60} (0.066 мг/мл). 1 – НФ/βНТФ, 2 – ФМЕ/βНТФ, 3 – НФ/ФМЕ, 4 – ФМЕ/ФДЕ.

Було виявлено, що дія фулеренів C_{60} супроводжувалася зниженням вмісту лактату та таурину на 20% та зростанням рівня Хол+ФХ+ГФХ та Кр+ФКр на 200% та 450% у клітинах АКЕ, відповідно (рисунок 2). Такі зміни вмісту лактату можуть свідчити про зниження рівня анаеробного гліколізу.

Низька доза БШВНТ спричиняла 20% зростання величин співвідношень НФ/βНТФ та ФМЕ/βНТФ, що відображає погіршення енергетичного метаболізму та зростання рівня гіпоксії. Експозиція до високої дози БШВНТ супроводжувалася зростанням співвідношення ФМЕ/βНТФ, що свідчило про інтенсифікацію гіпоксії, проте зниження величини співвідношення НФ/ФМН на 40% може свідчити про активацію енергетичного метаболізму. Інкубація клітин АКЕ з обома дозами БШВНТ спричиняла 60% (0.5 мг/миша) та 289% (1.5 мг/миша) зростання величини співвідношення ФМЕ/ФДЕ, що свідчить про активацію синтезу компонентів мембран (рисунок 1А).

Експозиція клітин АКЕ до низької дози БШВНТ супроводжувалася зниженням вмісту Хол+ФХ+ГФХ на 23% та зростанням рівня лактату на 17%. Однак висока концентрація БШВНТ спричиняла 30% зниження вмісту лактату.

Функціонування клітин безпосередньо залежить від фізико-хімічних характеристик мембран, що, зокрема, визначаються кількісним та якісним складом фосфоліпідів. У досліджуваних клітинах АКЕ спостерігалися характерні зміни кількості основних фосфоліпідів. Так, експозиція до фулеренів C_{60} супроводжувалася зниженням вмісту ФтХ (на 15%), ПлФтХ (на 28%), ФтС (на 61%), ФтЕА (на 20%) та ПлФтЕА (на 34%). Окрім того дія даних наночастинок спричиняла зниження величини співвідношення ФтХ/СМ на 20% (рисунок 2А).

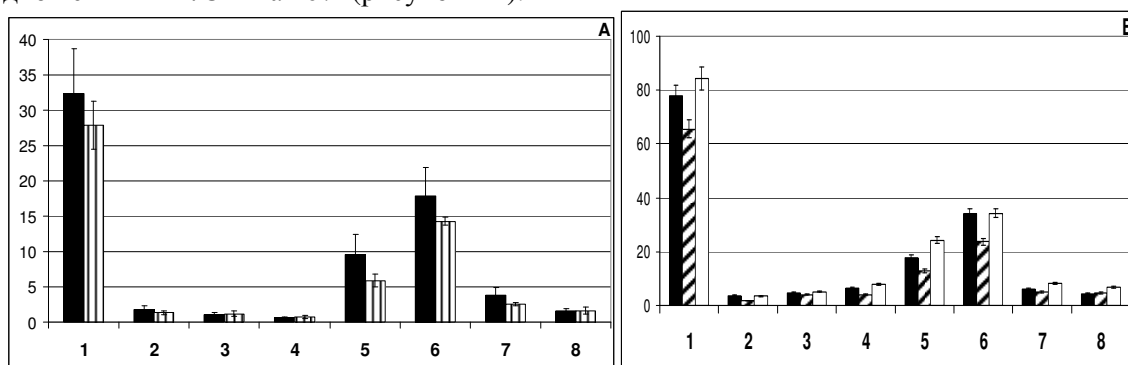


Рисунок 2 – Вміст фосфоліпідів у клітинах АКЕ, що інкубованих з ВНЧ. (А) Вплив фулеренів C_{60} на рівень фосфоліпідів у клітинах АКЕ: ■ – контрольні клітини; ▨ – клітини, інкубовані з фулеренами C_{60} (0.066 мг/мл). (В) Дія БШВНТ на вміст фосфоліпідів у клітинах АКЕ: ■ – контрольні клітини; ▨ – клітини, інкубовані з БШВНТ (0.5 мг/миша); □ – клітини, інкубовані з БШВНТ (1.5 мг/миша). 1 – ФтХ, 2 – ПлФтХ, 3 – ФтІ, 4 – СМ, 5 – ФтС, 6 – ФтЕА, 7 – ПлФтЕА, 8 – кардіоліпін.

Низька концентрація БШВНТ спричиняла зниження вмісту ФтХ (на 16%), ПлФтХ (на 51%), СМ (на 37%), ФтС (на 29%) та ФтЕА (на 31%). Інкубування клітин АКЕ з низькою дозою БШВНТ спричиняла зростання величини співвідношення ФтХ/СМ на 34%. Дія високої концентрації БШВНТ проявлялася у зростанні рівня СМ (на 20%), ФтС (на 35%), ПлФтЕА (на 33%) та кардіоліпіну (на 53%) та незначному зменшенні величини співвідношення ФтХ/СМ (рисунок 3).

Відомо, що ФтС виступає в якості кофактора протеїнкінази С (ПКС), активність якої зростає при проліферації [11]. ФтС також виступає в якості одного з маркерів на ранніх етапах апоптозу [12]. Отже, зміни вмісту цього фосфоліпиду можуть впливати на перебіг вищезгаданих процесів.

Відповідна структура внутрішньої мітохондріальної мембрани, а також взаємодія між кристами та зовнішньою мембраною є залежними від наявності кардіоліпіну [13]. У клітинних лініях ссавців, що характеризуються недостатністю кардіоліпіну, виявлено значні зміни ультраструктури мітохондрій та слабку осмотичну стабільність цих органел [14]. Окрім того відомо, що кардіоліпін забезпечує зв'язування цитохрому *c* на внутрішній мембрані мітохондрій. Зниження вмісту цього фосфоліпиду супроводжується вивільненням цитохрому *c* при апоптозі [15, 16]. Зниження рівня кардіоліпіну могло спричинити осмотичну нестабільність мітохондрій та порушення процесів окисного фосфорилування [14] або свідчити про посилення апоптозу [15].

Величина співвідношення ФтХ/СМ характеризує фізико-хімічні властивості мембран. Зменшення величини цього співвідношення вказує на підвищення структуризації мембран, а його зростання – на зменшення в'язкості мембран [17].

Таким чином, фулерени C_{60} аналогічно до низької дози БШВНТ спричиняють зниження вмісту майже всіх фосфоліпідів. Навпаки, експозиція до високої концентрації БШВНТ супроводжувалася зростанням рівня фосфоліпідів. Нами було показано, що структуризація клітинних мембран зменшувалася у клітинах при дії низької дози БШВНТ. Протилежний ефект спостерігався при дії фулеренів C_{60} чи високої концентрації БШВНТ.

Відомо, що визначення вмісту МЛД в клітинах методом протонної ЯМР-спектроскопії дозволяє оцінити комплексні зміни, що відбуваються в плазматичній мембрані і цитоплазмі клітин при розвитку апоптозу [18]. Наявність ^1H ЯМР-видимих МЛД є характерною рисою пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo* [19].

Було виявлено, що фулерени C_{60} спричиняють незначне зростання рівня МЛД (на 19%) в клітинах АКЕ, але вміст холіну при цьому знижувався на 49%, порівняно з контрольними клітинами. Такий ефект може бути пов'язаний з апоптоз-асоційованими змінами в клітинах, що піддавалися дії фулеренів C_{60} . Експозиція до БШВНТ супроводжувалася лише незначним зниженням вмісту МЛД та рівня холіну (табл.1).

Таким чином, встановлено, що інкубування клітин з БШВНТ супроводжувалося інтенсифікацією гіпоксії та активацією синтезу компонентів мембран, в той же час фулерени C₆₀ спричиняли протилежні ефекти. Фулерени C₆₀ та висока доза БШВНТ спричиняли активацію енергетичного метаболізму та зниження проникності клітинних мембран, хоча низька доза БШВНТ мала протилежну дію. Обмін фосфоліпідів погіршувався при дії фулеренів C₆₀ або низької концентрації БШВНТ, проте, експозиція клітин АКЕ до високої дози БШВНТ спричиняла зростання вмісту фосфоліпідів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Михайленко В.М., Михайленко П.М., Слейко Л.О.. Нанотехнології - перспективи застосування та ризику для здоров'я людини // Онкологія. – 2008. – Т.10, №4. – С. 420-429.
2. Schulte P.A., Salamanca-Buentello F. Ethical and scientific issues of nanotechnology in the workplace // Environ. Health Perspect. – 2007. – Vol.115, №1. – P. 5-12.
3. Helland A., Wick P., Koehler A., et al. Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes // Environ. Health Perspect. – 2007. – Vol.115, №8. – P. 1125-1131.
4. Shvedova A.A., Kisin E.R., Porter D. Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two faces of Janus? // Pharmacology and Therapeutics. – 2009. – Vol. 121. – P. 134-1147.
5. Gwinn M.R., Vallyathan V. Nanoparticles: health effects--pros and cons // Environ. Health Perspect. – 2006. – Vol.114, №12. – P. 1818–1825.
6. Hakumaki J.M., Brindle K.M. Techniques: Visualizing apoptosis using nuclear magnetic resonance // Trends Pharm. Sci. – 2003. – Vol.24, №3. – P. 146-149.
7. Bubnovskaya L., Mikhailenko V., Kovelskaya A., Osinsky S. Bioenergetic status and hypoxia in Lewis lungs carcinoma assessed by ³¹P NMR spectroscopy: correlation with tumor progression // Exp. Oncol. – 2007. – Vol.29, №3. – P. 207-211.
8. Katz-Brull R., Seger D., Rivenson-Segal D., et al. Metabolic markers of breast cancer: enhanced choline metabolism and reduced choline-ether-phospholipid synthesis // Cancer Research. – 2002. – Vol.62 – P. 1966–1970.
9. Robinson S.P., Borton S.J., McSheehy P.M.J., Griffiths J.R. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of cancer // Brit. J. Radiology. – 1997. – Vol.70. – P. 60-69.
10. Sterin M., Cohen J.S., Mardor Y., et al. Levels of phospholipid metabolites in breast cancer cells treated with antimetabolic drugs: a ³¹P-magnetic resonance spectroscopy study // Cancer Research. – 2001. – Vol.61. – P. 7536-7543.
11. Ron D., Kazanietz M.G. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors // The FASEB Journal. – 1999. – Vol.13. – P. 1658-1676.
12. Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Zhao Q., et al. Oxidation of phosphatidylserine: a mechanism for plasma membrane phospholipids scrambling during apoptosis // Biochemical and biophysical research communications. – 2004. – Vol.324. – P. 1059-1064.
13. Schlame M., Shanske S., Doty S., et al. Microanalysis of cardiolipin in small biopsies including skeletal muscle from patients with mitochondrial disease // Journal of Lipid Research. – 1999. – Vol.40. – P. 1585-1592.
14. Koshkin V., Greenberg M.L. Cardiolipin prevents rate-dependent uncoupling and provides osmotic stability in yeast mitochondria // Biochem. J. – 2002. – Vol.364. – P. 317-322.
15. Iverson S.L., Enoksson M., Gogvadze V. et al. Cardiolipin is not required for Bax-mediated cytochrome c release from yeast mitochondria // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol.279, №2. – P. 1100-1107.
16. Petrosillo G., Ruggiero F. M., Paradies G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria // FASEB J. – 2003. – Vol.17. – P. 2202-2208.
17. Chekhun V.F., Tryndiak V.P., Todor I.M., Mikhailenko V.M. et al. Phospholipids and cholesterol content in tumor cell plasma membranes with different sensitivity to doxorubicin // The Ukrainian Biochemical Journal. – 2003. – Vol.75, №4. – P. 120-125.
18. Blankenberg F.G., Katsikis P.D., Storrs R.W. et al. Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy // Blood. – 1997. – Vol.89, №10. – P. 3778-3785.
19. Mountford C.E., Wright L.C. Organization of lipids in the plasma membranes of malignant and stimulated cells: a new model // Trends Biochem. Sci. – 1988. – Vol.13. – P. 172-177.

