УДК 57.085.23

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

© 2023 г. О. П. Кисурина-Евгеньева^{1,} *, М. А. Савицкая¹, Д. С. Смешнова¹, Г. Е. Онищенко¹

¹Биологический 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 ТіО₂ широко применяются в промышленности, фармакологии, медицине. В последнее время предлагается использовать наночастицы TiO₂ 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 TiO₂ (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 ТіО₂ замедляет пролиферацию и вызывает уменьшение числа энтозов. Элементный анализ с помощью аналитической электронной микроскопии выявил присутствие TiO₂ в эндосомном компартменте, в цитозоле и во внеклеточном пространстве. Методом иммунохимического окрашивания показано, что оба типа наночастиц ТіО₂ в концентрации 10 мкг/мл нарушают образование адгезивных контактов, в т.ч. и на ранних стадиях энтоза. Воздействие частиц анатаза индуцирует транслокацию белка р53 в ядра клеток. В целом, использованные в работе наночастицы TiO₂ 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 (TiO₂), применяемый в фармакологии при изготовлении оболочек таблетированных препаратов, при изготовлении декоративной косметики, в производстве красок и т.д. (Fage et al., 2016). В природе ТіО₂ 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 реакционноспособным из-за наличия фотокаталитических свойств (Hurum et al., 2005). Цитотоксичность наночастиц ТіО₂ была показана на различных типах культивируемых клеток. Наночастицы TiO₂ 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 активацию 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 TiO₂ 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 TiO₂ in vivo обнаружено не было. В связи с этим, в последнее время разрабатываются способы клинического использования наночастиц TiO₂ 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 TiO₂ может являться влияние собственно наночастиц на различные процессы, проходящие в опухолевых тканях, в т.ч. стимулирующих опухолевую 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 (Krajcovic 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 (TiO₂) 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 TiO₂. 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 (PAA Laboratories, Австрия) и 80 мг/мл гентамицина (ПанЭко) при 37°С и 5% СО₂. Клетки высаживали в чашки Петри на покровные стекла в концентрации 200 тыс./мл. Через 24 ч к клеткам добавляли наночастицы TiO₂ в форме анатаза размером менее 25 нм (далее А25) (Sigma, 637254, США) или наночастицы, состоящие из смеси анатаза и рутила, с размером менее 75 нм (далее АР75) (Sigma, 13463-67-7, США). Культивирование клеток в присутствии наночастиц проводили в течение трех сут. Концентрация наночастиц TiO₂ составляла 1, 10 или 100 мкг/мл.

Морфологический анализ. Клетки фиксировали 96% этанолом (-20° С) 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 наночастииц 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 В-катенина и р53 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 мышиными моноклональными антителами против белка β-катенина (C7207; Sigma, США) в течение 30 мин при 37°С. Для выявления белка р53 клетки окрашивали мышиными моноклональными антителами против белка р53 (Р5813; Sigma, США) 30 мин при 37°С. В качестве вторых антител использовали антитела против иммуноглобулина мыши, конъюгированные с Alexa Fluor-488 (Invitrogen, США), окрашивали 30 мин при 37°С. 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 изображении измеряли общий периметр клеток (Р) и длину L межклеточного прикрепления по окрашиванию антителами против белка β-катенина, число измерений *и* 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 яркофлуоресцирующие (60–90). Число проанализированных клеток в контроле – 1467 шт., в присутствии нано-



Рис. 1. Электронно-плотные частицы в клетках МСF-7, культивировавшихся в присутствии наночастиц TiO₂ A25 (*a*) и AP75 (*b*). Стрелки указывают на электронно-плотные частицы.

частиц А25 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 p53 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 ТіО₂ (А25 или А75 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 рН 7.2 и контрастировали 1.5%-ным раствором уранилацетата в 70%-ном этаноле. Ультратонкие срезы толщиной 60 нм изготавливали с помощью алмазного ножа на ультрамикротоме LKB 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 спектрометрии (ЭДС) характеристического рентгеновского излучения, основанном на регистрации рентгеновских фотонов, испускаемых образцами при их облучении пучком электронов, и измерении их энергий энергодисперсионным 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-

ЦИТОЛОГИЯ том 65 № 3 2023

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 $p \le 0.05$. 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 TiO₂ в клетках MCF-7. Электронная микроскопия. Для того чтобы убедиться в накоплении наночасти TiO₂, 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. 3δ), что указывает на проникновение их в клетку путем эндоцитоза. Везикулы на электронномикроскопическом уровне характеризовались разной морфологией. Часть везикул с наночастицами TiO₂ имела однородное содержимое и, по-видимому, принадлежала к компартменту ранних эндосом (рис. 3δ). Другая часть везикул содержала мембранные структуры, и, вероятно, принадлежала к компартменту поздних эндосом (мультивезикулярных



Рис. 2. Наночастицы TiO₂ (10 мкг/мл) A25 и AP75 в клетках культуры MCF-7 (элементный анализ). *а*, *в* – Электронно-микроскопическая фотография наночастиц TiO₂ в форме анатаза (25 нм) и анатаза с рутилом (75 нм) соответственно. *б*, *е* – Энергодисперсионный спектр области (спектр 1 и спектр 2 соответственно); по оси абцисс – энергия рентгеновского излучения, кэВ, по оси ординат – интенсивность характеристического рентгеновского излучения; стрелками отмечены пики, характерные для TiO₂, концентрация наночастиц – 10 мкг/мл.

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

Митотический, апоптотический и энтотический индексы при воздействии наночастиц TiO₂. Для оценки влияние наночастиц на культивируемые клетки MCF-7 были измерены митотический, апоптотический и энтотический индексы на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином (рис. 4а). Воздействие обеих форм наночастиц TiO₂ в концентрации 10 и 100 мкг/мл вызывало уменьшение митотического индекса и увеличение апоптотического индекса по сравнению с контролем ($p \le 0.05$ по Манну–Уитни). Апоптотический индекс в присутствии наночастиц А25, 100 мкг/мл был выше по сравнению с АР75 в той же концентрации ($p \le 0.05$ по Манну–Уитни). Для оценки влияния наночастиц на рост культуры был проведен подсчет клеток на единицу площади (рис. 4б). 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 возрастало менее чем в два раза. Таким образом, воздействие наночастиц TiO₂, начиная с концентрации 10 мкг/мл, вызывает уменьшение митотического индекса, возрастание апоптотического индекса и, в целом, приводит к замедлению роста культуры. Хотя TiO₂ (100 мкг/мл) образует агрегаты на поверхности клеток (рис. 5), сохраняется митотическая активность и нет значительной гибели клеток.

Энтотический индекс при добавлении в среду культивирования наночастиц A25 и AP75 дозозависимо уменьшался по сравнению с контролем (рис. 4*a*). В присутствии 100 мкг/мл наночастиц и одного, и другого типа встречались единичные картины "клеткав-клетке", что указывает на подавление процесса энтоза.

Влияние наночастиц TiO₂ на прохождение энтоза в клетках MCF-7. В клетках MCF-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 (энтозной) клеткой. Признаки деградации внедрившейся клетки не выявляются. На второй стадии внедрившаяся клетка начинает терять контакты с мембраной энтозной ваку-



Рис. 3. Наночастицы TiO₂ 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, *c* – в поздней эндосоме, *д* – в цитоплазме апоптотической клетки, *e* – в цитоплазме митотической клетки; на врезках *д*, *e* 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-

ЦИТОЛОГИЯ том 65 № 3 2023

частиц TiO₂ 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 TiO₂ встречались единичные энтозы, что не позволило провести какой-либо анализ.

Адгезивные контакты клеток в присутствии наночастиц TiO_2 . Падение энтотического 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 иммуноцитохимическое окрашивание β -катенина.

В контроле адгезивные контакты выявлялись по всей периферии контактирующих клеток и имели четкие границы (рис. 76). В присутствии наночастиц TiO₂ 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. 7*в*, *г*). Подобные нарушения были отмечены в присутствии наночастиц как A25, так и AP75, начиная с концентрации 1 мкг/мл. Для подтверждения данных имуноцитохимии была измерена длина адгезивных контактов. Как видно из приведенной на рис. 7*а* гистограммы, воздействие наночастиц TiO₂ уменьшало протяженность межклеточных контактов, при этом наночастицы АР75 оказывали большее повреждающее действие, чем наночастицы А25 при тех же концентрациях.

Анализ протяженности адгезивных контактов на I и II стадиях энтоза показал нарушение их формирования (рис. 7*в*, *г*, *врезки*) в присутствии наночастиц TiO₂, в то время как в контроле адгезивные контакты на начальных стадиях энтоза выявляются на всем протяжении энтозной вакуоли (рис. 7*б*, *врезка*).

Распределение белка p53 при воздействии наночастиц TiO₂ 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 TiO₂ вызывало уменьшение митотического индекса и возрастание апоптотического индекса, мы проанализировали распределение p53 в контроле и в присутствии наночастиц TiO₂.

Иммуноцитохимическое окрашивание в контроле выявило небольшое количество слабо-флуоресцирующих ядер клеток (рис. 86). При воздействии наночастиц А25 (10 мкг/мл) наблюдали увеличение доли ярко флуоресцирующих ядер (рис. 86). В присутствии наночастиц АР75 (10 мкг/мл) картина распределения и интенсивности флуоресценции была сходна с контролем (рис. 82).

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. *a* – Изменение митотического (MИ), апоптотического (AИ) и энтотического (ЭИ) индексов в клетках; A25 — наночастицы анатаза размером 25 нм, AP75 — смесь наночастиц анатаза и рутила размером 75 нм; (*) – различия относительно к достоверны при *p* \leq 0.05 (критерий Манн–Уитни); *б* – изменение числа клеток при культивировании в присутствии наночастиц TiO₂ (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 МСF7 в присутствии наночастиц TiO₂ (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 МСF-7 и в присутствие 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.

ЦИТОЛОГИЯ том 65 № 3 2023



Рис. 7. Адгезивные контакты клеток MCF-7 в присутствии 10 мкг/мл наночастиц TiO₂ (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 $p \le 0.05$ (по *t*-критерию Стьюдента). δ , ε , c – Иммуноцитохимическое выявление β -катенина (*зеленый сигнал*); энтозы представлены в отдельных врезках, \Im – энтозная клетка, B – внедрившаяся клетка, стрелка указывает на адгезивный контакт между энтозной и внедрившейся клетками; δ – контроль, ε , c, – воздействие 10 мкг/мл наночастиц TiO₂ (A25 или AP75), ядра клеток докрашены DAPI (синий сигнал).

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

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

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 ($p \le 0.05$ 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 МСF-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* ≤ 0.05 (*t*-критерий Стьюдента). *б*, *в*, *c* – Иммуноцитохимическое выявление белка p53 (зеленый цвет) в клет-ках МСF-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 МСФ7 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 идекса может быть опосредовано выходом поглошенных 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	2. Наличие	белка р53	в ядрах	энтозных	(Э) и
внедривш	ихся (В) кл	еток в прис	утствии	наночасти	ι TiO ₂

Наночастицы ТіО ₂	Э-клетки (I и II стадии)		В-клетки	
	p53+	p53	p53+	p53
Нет, контроль (<i>n</i> = 34)	12	22	16	9
A25, 1 мкг/мл (<i>n</i> = 5)	4	1	3	1
A25, 10 мкг/мл (<i>n</i> = 5)	2	3	2	2
АР75, 1 мкг/мл (<i>n</i> = 9)	1	8	0	4
АР75, 10 мкг/мл (<i>n</i> = 5)	0	4	3	1

Примечание. n — Число проанализированных клеток; $p53^+$ и $p53^-$ – соответственно p53, содержащийся и не содержащийся в ядрах.

ЦИТОЛОГИЯ том 65 № 3 2023

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 р53 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 АР75 возможно не способны проникать через ядерную пору и повреждать ДНК, поэтому мы не наблюдаем перемещения р53 в ядро. Тем не менее, в присутствии этих наночастиц также происходит увеличение апоптотического индекса и падение митотического индекса. Возможно, механизм активашии апоптоза и замедления клеточного шикла в данном случае не связаны с работой р53. В целом первая часть работы показала, что частицы А25 обладают большей повреждающей способностью, чем АР75. Повышенное (по сравнению с контролем) накопление р53 в ядрах клеток при воздействии анатазных наночастии может являться механизмом активации клеточной гибели.

Воздействие наночастиц TiO₂, как A25, так и АР75, 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 кадгерины 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-Евгеньева и др., 2018; Durgan et al., 2018). Так как TiO_2 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. прохоляший с нарушением шитокинеза и заканчивающийся образованием полиплоидной клетки (Krajcovic et al., 2011). Снижение митотической активности в присутствии ТіО₂ 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 р53-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 А25, по сравнению с АР75, 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 TiO_2 на культуру опухолевых клеток молочной железы приводит к подавлению энтоза. Так как наличие энтозов может приводить к полиплоидизации клеток (Krajcovic et al., 2011), наночастицы TiO_2 оказывают положительное влияние на генетическую стабильность в популяции. Кроме того, в присутствии наночастиц TiO_2 , замедляется пролиферация опухолевых клеток. В целом, полученные результаты демонстрируют, что наночастиц TiO_2 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 glycolmodified 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
- pathways involved in cytotoxicity and genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on cells constitutive of alveolocapillary 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.,

ЦИТОЛОГИЯ том 65 № 3 2023

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 1 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., Pylkkänen 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-ma-

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 NaYF 4: 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 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

294