

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 546.28:543.25:578.08

©Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОТЕОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ

О.Н. Тананова^{1}, Е.А. Арианова^{1*}, И.В. Гмошинский¹, И.Ю. Торопыгин²,
Е.В. Хряпова², Н.В. Трусов¹, С.А. Хотимченко¹, В.А. Тутельян¹*

¹Научно-исследовательский институт питания,
109240, Москва, ул. Устьинский проезд, д.2/14; тел.:(495) 698-53-68;
эл. почта: 2981868@mail.ru; aria-elena@yandex.ru

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича, Москва

Методом 2D-электрофореза с последующей идентификацией масс-спектра был изучен протеомный профиль микросом печени крыс под влиянием ежедневного внутрижелудочного введения водной дисперсии наночастиц (НЧ) диоксида кремния в дозах от 1,0 до 100 мг/кг массы тела на протяжении 28 дней. Микросомальную фракцию выделяли из печени методом дифференциального центрифугирования. Состав белков микросомальной фракции анализировали методом 2D-электрофореза в полиакриламидном геле. Идентификацию белковых пятен осуществляли с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа. Масс-спектрометрический анализ позволил выявить белок GRP78 (78 kD glucose-regulated protein precursor), принадлежащий к семейству белков теплового шока, который присутствовал в контрольной группе и не выявлялся у крыс 2-й (1 мг/кг массы тела/день) и 3-й групп (10 мг/кг массы тела/день) под воздействием НЧ. Данный белок обладает биологической активностью шаперона и локализован преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме и плазматической мембране клеток печени. Обсуждаются возможные механизмы воздействия искусственных наночастиц на биосинтетические процессы в организме.

Ключевые слова: оксид кремния, наночастицы, крысы, двумерный электрофорез, белки теплового шока, GRP78.

ВВЕДЕНИЕ

Быстрое развитие нанотехнологий и nanoиндустрии в нашей стране и за рубежом и возрастающее внедрение наноматериалов и продукции на их основе в повседневную производственную и бытовую практику свидетельствуют о том, что в ближайшей перспективе ожидается всё более тесный контакт человека с наноматериалами. Сегодня в мире проблемы безопасности наноматериалов и нанотехнологий выходят на одно из первых мест по важности и, соответственно, по числу работ в этой области [1].

Поскольку наноматериалы являются принципиально новым видом материалов, у них возможно наличие ранее неизвестных свойств, некоторые из которых могут привести к нежелательным последствиям на организм человека и экологические системы [2]. Анализ

данных литературы показал, что наночастицы (НЧ) обычно обладают более высокой токсичностью по сравнению с частицами микронных размеров [3].

Для оценки безопасности НЧ большое значение имеет выбор чувствительных биомаркеров токсического действия. С этой целью в последнее время начинают внедряться методы, позволяющие выявить воздействие НЧ на геном, экспрессию генов и, в результате этого, на состав синтезируемых функционально значимых белков, что находит отражение в усилении или подавлении биосинтеза, а также появлении новых белков, регистрируемых на протеомных картах биологических объектов [4-6]. В качестве одного из таких методов получил распространение двумерный (2D) электрофорез, используемый как один из компонентов системы протеомного анализа.

* - адресат для переписки

Успех протеомного анализа в большой степени зависит от удачного выбора объекта исследования, содержащего разнообразный набор функционально-значимых белков без резкого преобладания отдельных “мажорных” фракций. Этим требованиям удовлетворяет фракция мембран эндоплазматического ретикулума метаболически активных клеток (так называемая микросомальная фракция), в которой сосредоточены ферменты 1-й и 2-й фазы детоксикации ксенобиотиков, нарушение активности которых может приводить к развитию различных патологических процессов [7].

Среди производимых в промышленных масштабах наноматериалов особое внимание привлекает наноструктурный аморфный диоксид кремния, представленный частично агрегированными наночастицами размером не более 30 нм, обладающими различной степенью пористости. Этот продукт в настоящее время широко используется в технике в качестве мягких абразивов, адсорбентов, наполнителей в различных конструкционных материалах, носителей для катализаторов в химической промышленности. В области пищевых производств он используется в качестве пищевой добавки E551 [8], которая применяется в соответствии с требованиями Таможенного Союза ЕврАзЭС “Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)”. Норматив использования E551 в указанных видах продукции варьирует обычно от 10 до 30 г/кг, причём в ряде случаев применение диоксида кремния в продукции регламентировано только технической документацией изготовителей [8].

Целью настоящей работы явилось экспериментальное исследование протеома микросомальной фракции печени крыс при воздействии на организм животных наночастиц аморфного диоксида кремния, вводимых в желудочно-кишечный тракт, и изучение возможных изменений в протеомном профиле микросомальных белков.

МЕТОДИКА

В работе применяли наноструктурный диоксид кремния производства фирмы “Sigma-Aldrich” (Германия-США). По данным трансмиссионной электронной микроскопии в составе водной дисперсии продукта выявлялись НЧ аморфного диоксида кремния, частично агрегированные в кластеры субмикронного размера, средней длиной около 30 и шириной – 20 нм (рис. 1).

Исследование проведено на 24 крысах-самцах линии Вистар исходной массой тела 80 ± 2 г, полученных из питомника РАМН “Столбовая”.

Животные были разделены на 4 группы по 6 крыс в каждой. Крысам 1 (контрольной) группы вводили внутривенно деионизованную воду. Животным 2, 3 и 4 опытных групп вводили наноструктурный диоксид кремния в виде суспензии в дистиллированной воде в дозе 1,0; 10,0 и 100,0 мг/кг массы тела/день. За 12 ч до забоя у животных отбирали весь корм. Забор печени животных осуществляли на 29 день эксперимента под глубоким эфирным наркозом. Для получения микросомальной фракции ткань печени гомогенизировали в 0,1 М трис-НСl буфере, pH 7,4, охлаждённом до $0-+2^{\circ}\text{C}$, в соотношении 1:4 (масса:объём). Выделение микросомальной фракции гепатоцитов крыс проводили по стандартной методике дифференциального центрифугирования [9].

Белковый состав микросомальной фракции анализировали с помощью двумерного электрофореза. Наносимые на гелевые трубочки препараты микросом стандартизовали, используя метод Бредфорд. Содержание общего белка составило 20 мкг на 1 анализ. Первое направление (изоэлектрофокусирование в амфолинах) осуществляли в стеклянных трубочках с 4% полиакриламидным гелем (ПААГ) в градиенте pH 3-10 до достижения потенциала 900 В. Во втором направлении разделение осуществляли в 12% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [10]. Электрофорез проводили последовательно при токе 20 мА и 40 мА на одно стекло. Окраску осуществляли серебром с использованием наборов производства фирмы “Bio-Rad” (США). Изображения протеомных карт получали с помощью денситометра GS-800 (“Bio-Rad”).

Обработку изображений гелей проводили в программе PDQuest. Гидролиз белка трипсином и регистрацию масс-спектров проводили по ранее описанной методике [11].

Идентификацию характерных пятен белков проводили на время-пролётном масс-спектрометре MALDI BRUKER Ultraflex II (Германия), с УФ лазером (Nd) в рефлекторном режиме с регистрацией положительных ионов. Полученные пептидные спектры идентифицировали с использованием программного обеспечения MASCOT (www.matrixscience.com) и поисковой базой данных NCBItr (www.ncbi.nlm.nih.gov). Идентификацию белка считали достоверной, если вычисленный для него эмпирический критерий Mascot score превышал 86.

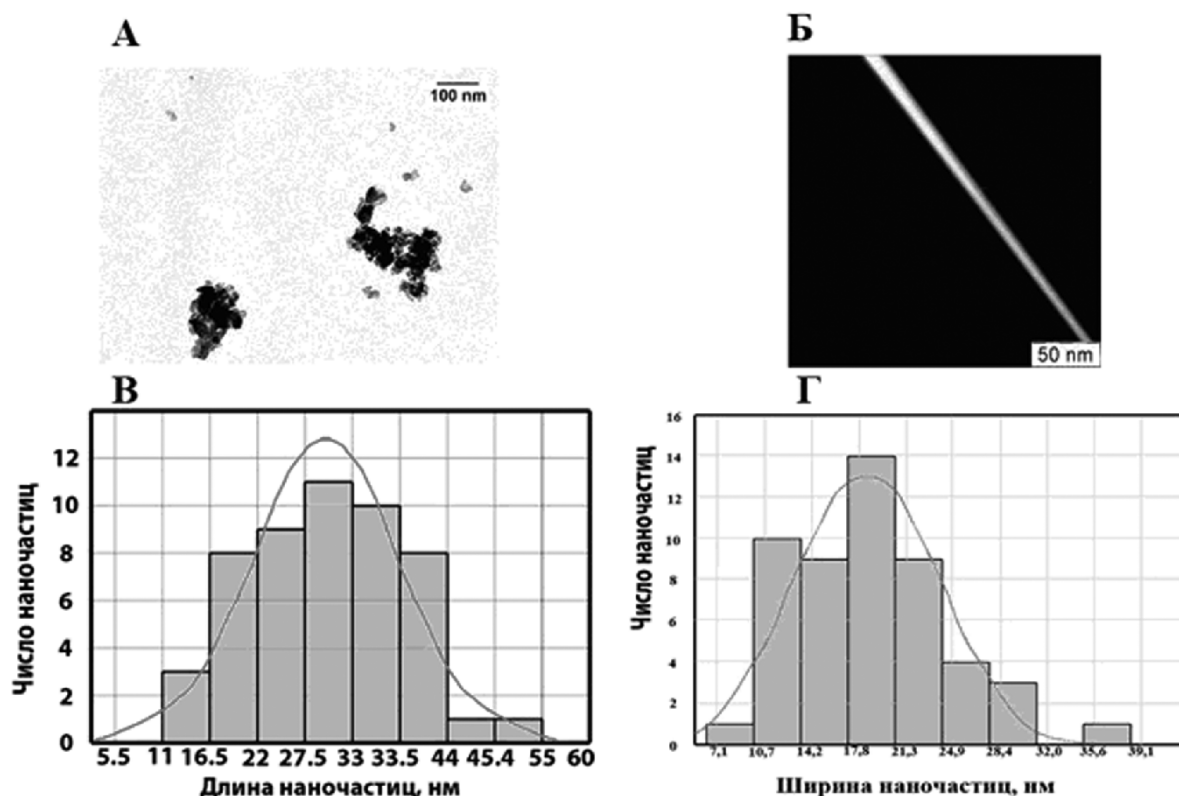


Рисунок 1. Результаты исследования образца НЧ SiO₂ методом трансмиссионной электронной микроскопии: **А** - микрофотография образца (увеличение $\times 90000$); **Б** - картина дифракции электронов, свидетельствующая об отсутствии кристаллической структуры образца; **В, Г** - распределение наночастиц по наибольшему (длина) и наименьшему (ширина) размеру. Данные получены на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова в рамках выполнения работ по государственному контракту № 01.648.12.3022 от 11.11.2008 с Минобрнауки РФ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Путём сравнения всех 24 электрофореграмм микросомальной фракции печени крыс был составлен “мастер”-гель, состоящий из 441 белковых пятен и 9 пятен стандартов молекулярных масс белков, представленных как минимум на 5 электрофореграммах в одной группе животных. Общий вид “мастер”-геля представлен на рисунке 2.

Результаты исследований показали, что у животных 1 группы в микросомальной фракции печени было обнаружено 445 белковых пятен, у животных группы 2 – 449, группы 3 – 446, группы 4 – 441. У всех экспериментальных групп животных (группы 2-4) в микросомальной фракции печени было выявлено в общей сложности 4 белковых пятна, которых не было у животных контрольной группы, и отмечено исчезновение 7 пятен (рис. 2).

На электрофореграммах был выявлен ряд белков, биосинтез которых в микросомальной фракции гепатоцитов изменяется под действием

НЧ диоксида кремния в разных дозах, однако масс-спектрометрически их не удалось идентифицировать, в виду их недостаточно высокой концентрации.

Исключение составил доминантный белковый пик, который не выявлялся под воздействием НЧ в микросомальной фракции печени 2 и 3 группы животных в дозах 1 и 10 мг/кг массы тела/день (рис. 2).

Полученный для него пептидный спектр (рис. 3) соответствует GRP78 (glucose-regulated protein precursor), белку с молекулярной массой около 80 кДа, который принадлежит к семейству белков теплового шока. Обнаруженные пептиды перекрывают 96% последовательности этого белка.

ОБСУЖДЕНИЕ

После введения в желудочно-кишечный тракт крыс наночастиц диоксида кремния отмечаются определённые изменения в спектре белков микросомальной фракции печени, включая

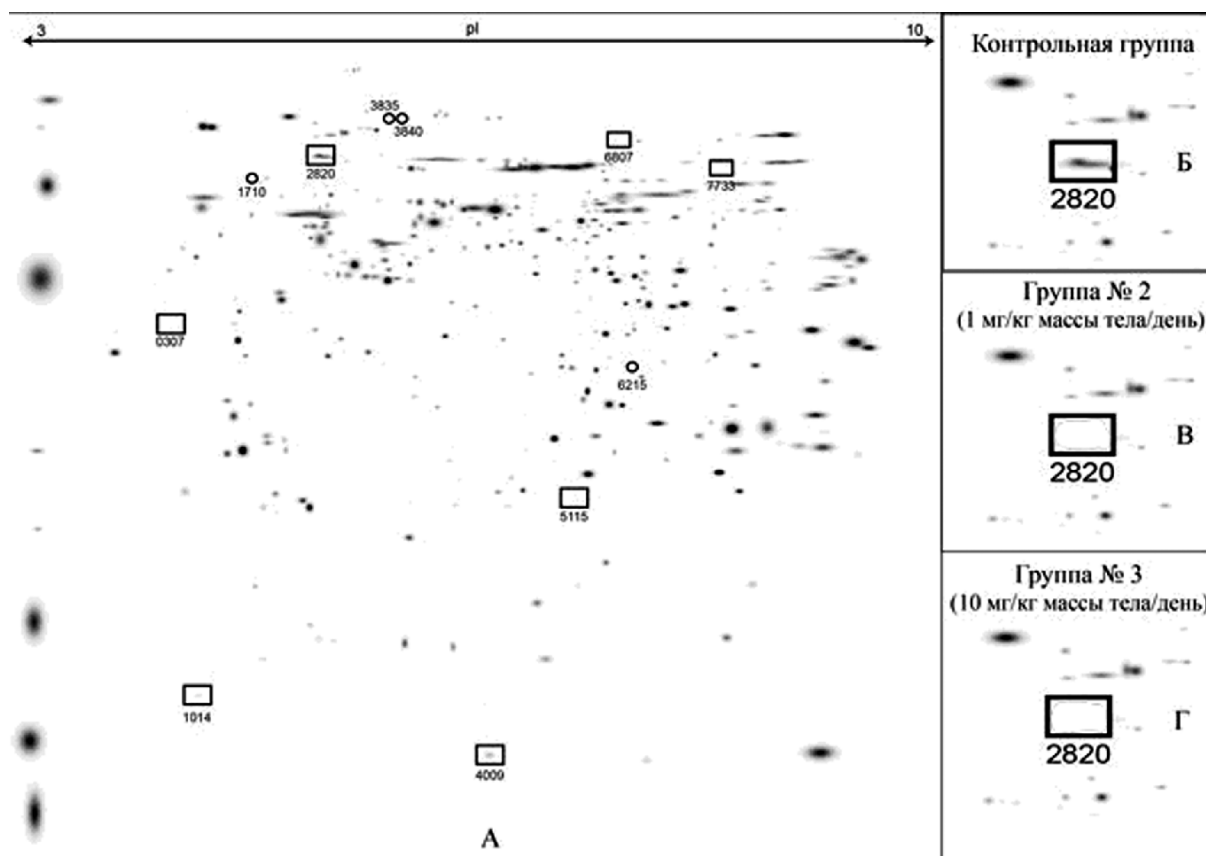


Рисунок 2. А - общий вид “мастер”-геля (протеомной карты) микросомальной фракции печени крысы всех группы. Б, В, Г - фрагменты геля для животных 1-ой, 2-ой и 3-ей группы демонстрирующие исчезновение белка GRP78. □ - белки, которые присутствуют в контрольной группе, но исчезают под воздействием НЧ; ○ - белки, которые отсутствуют в контрольной группе, но появляются под воздействием НЧ.

подавление биосинтеза идентифицированного белка GRP78. Согласно данным литературы, белок GRP78 локализован преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, однако имеются и данные о его присутствии в плазматических мембранах гепатоцитов [12]. По своей биологической функции он является шапероном, то есть белком, осуществляющим нормальное свёртывание третичной структуры синтезируемых *de novo* тканевых белков. Показано, что GRP78 необходим, в частности, для обеспечения целостности эндоплазматического ретикулума и участвует в процессах стресс-индуцированной аутофагии. Например, он может играть важную роль в адаптации и выживаемости клеток в условиях активации онкогенов. GRP78 и белки, структура которых формируется под его влиянием, играют роль в сборке мультимерных белковых комплексов эндоплазматического ретикулума [5, 12]. Имеющаяся информация, таким образом, характеризует GRP78 как один из ключевых компонентов системы посттрансляционного

процессинга белка в клетке, способного оказывать влияние на функциональное состояние большого числа ферментных систем, локализованных в эндоплазматическом ретикулуме. Возможные последствия снижения содержания GRP78 в мембранах клеток печени под воздействием НЧ диоксида кремния в настоящее время недостаточно изучены и требуют отдельного исследования.

В литературе имеется ряд данных, указывающих на изменения в биосинтезе белка под действием искусственных НЧ и наноматериалов [6]. О принципиальной возможности таких эффектов применительно к НЧ SiO₂ свидетельствуют данные исследований *in vitro* по влиянию наноматериала на клеточные культуры. В работе [13] с помощью биохимического и морфологического анализа, гель-проникающей двумерной хроматографии, а также масс-спектрометрии выявлено дозозависимое влияние НЧ аморфного SiO₂ размером 15 нм и 30 нм на биосинтез белков в культуре кератиноцитов человека линии HaCaT. Протеомный анализ показал,

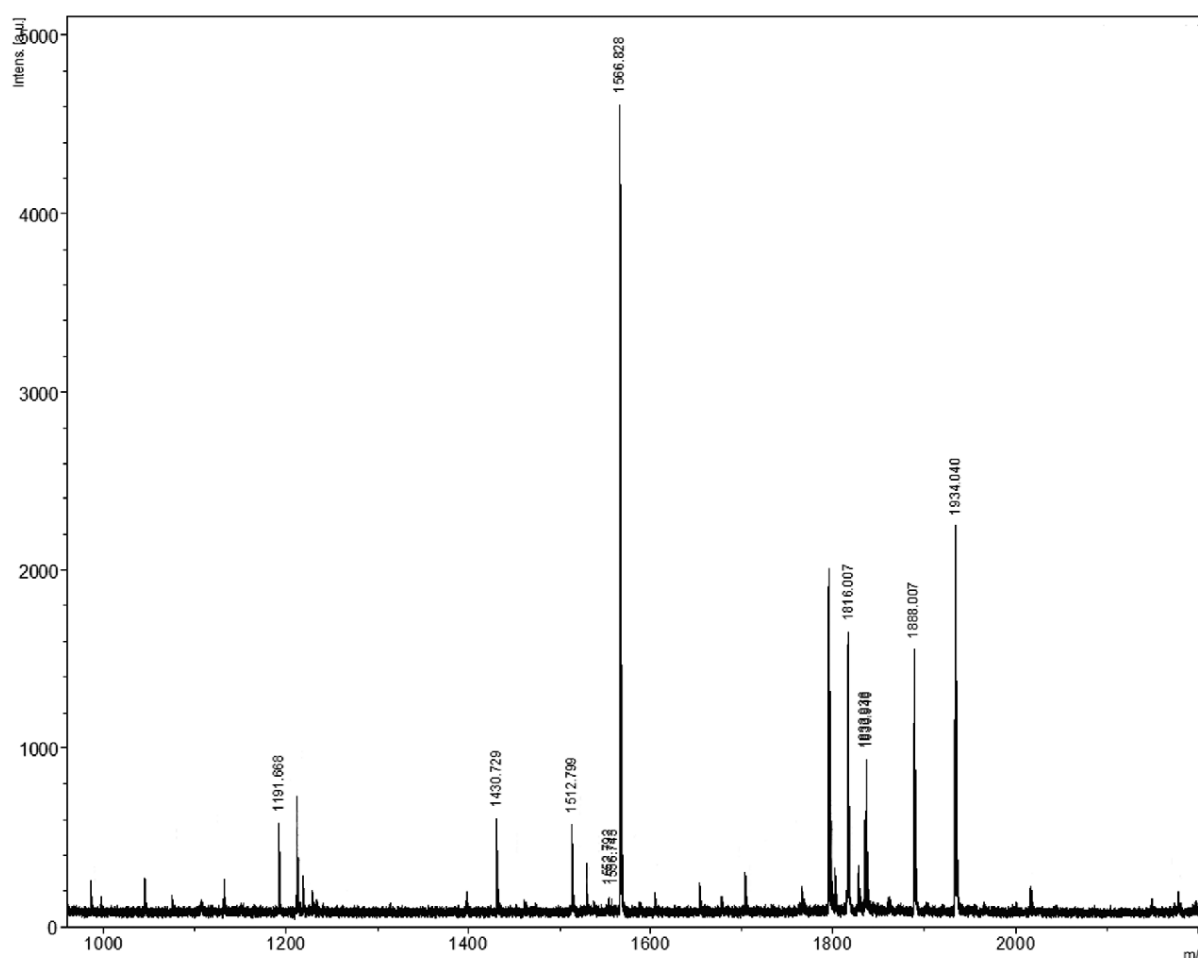


Рисунок 3. Масс-спектр пептидов, полученных в результате трипсинолиза идентифицированного белка GRP78.

что к действию НЧ SiO_2 *in vitro* было восприимчиво 16 белков, причём уровень проявления этого эффекта зависел от размера частиц. Эти белки были идентифицированы с помощью MALDI-TOF-TOF-MS анализа, и могли быть разделены на 5 категорий, в соответствии с их функциями: белки окислительного стресса, белки цитоскелета, молекулярные шапероны, белки энергетического обмена, белки апоптоза и опухолевые белки.

В работе [14] воздействию НЧ SiO_2 подвергали нормальные клетки печени линии L-02. При этом для НЧ размером 21 нм и концентрации в среде культивации от 0,2 до 0,6 мг/мл отмечены эффекты апоптоза клеток, биосинтеза белковых регуляторных факторов p53 и Вах. Механизм наблюдаемых эффектов авторы работы объясняют окислительным стрессом, связанным с каталитической генерацией реакционноспособных форм кислорода (РСК) на межфазной границе НЧ

Необходимо отметить, что все вышеперечисленные данные были получены в системах *in vitro*, при непосредственном воздействии НЧ на культуры клеток. Результаты, полученные в данной работе, показывают, что НЧ диоксида кремния способны оказывать воздействие и на протеом организма *in vivo*, при поступлении в желудочно-кишечный тракт. С учётом литературных данных, можно рассмотреть гипотетически 2 возможных механизма воздействия НЧ – прямой и опосредованный.

Прямой механизм связан с тем, что НЧ могут проникать во внутреннюю среду организма и в клетки, где вызывают генерацию активных форм кислорода (АФК), которые могут вызывать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и образование в клетке липоперекисей, которые легко проникают через мембраны, в частности, через мембрану ядра и могут воздействовать на экспрессию генов.

Опосредованный механизм, который не требует проникновения НЧ во внутреннюю среду организма, связан с тем, что при влиянии НЧ на микрофлору толстой кишки изменяется спектр синтезируемых этой микрофлорой метаболитов. Эти метаболиты обладают иммуномодулирующим действием, они влияют на активность клеток иммунной системы, главным образом макрофагов и лейкоцитов, которые под воздействием этих изменяющихся факторов со стороны кишечной микрофлоры начинают менять синтез иммунологически активных регуляторов, особенно цитокинов. Цитокины в свою очередь, связываясь с большим числом клеток мишеней, в частности с клетками печени, запускают в них внутриклеточные процессы, которые приводят к изменению экспрессии генов и как следствие к сдвигам в составе протеома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, пероральное введение животным на протяжении 28 дней наночастиц диоксида кремния (размер частиц 10 ± 20 нм) в концентрациях 1, 10, 100 мг/кг массы тела в день влияет на экспрессию отдельных белков микросомальной фракции печени крыс, что согласуется с данными работ, полученными в системах *in vitro* [6, 14] и свидетельствует о возможности оказания этими НЧ системного воздействия на организм при поступлении в желудочно-кишечный тракт. Данное обстоятельство необходимо учитывать в ходе гигиенического нормирования наноструктурированного SiO_2 , применяемого в качестве пищевой добавки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Хамидулина Х.Х., Давыдова Ю.А. (2011) Токсикологический вестник, №6, 53-57.
2. Тутельян В.А., Онищенко Г.Г. (2007) Вопр. питания, 76(6), 4-8.
3. Радилов А.С., Дулов С.А., Глушкова А.В. (2011) Гигиена и санитария, №2, 81-86.
4. Ye Y., Liu J., Xu J., Sun L., Chen M., Lan M. (2010) Toxicol. In Vitro, 24, 751-758.
5. Yang X., Liu J., He H., Zhou L., Gong C., Wang X., Yang L., Yuan J., Huang H., He L., Zhang B., Zhuang Z. (2010) Part Fibre Toxicol., 7, 1-12.
6. Тананова О.Н., Арианова Е.А., Гмошинский И.В., Аксенов И.В., Згода В.Г., Хотимченко С.А. (2012) Вопр. питания, 81 (2), 18-22.
7. Канаева И.П., Петушкова Н.А., Лохов П.Г., Згода В.Г., Карузина И.И., Лисица А.В., Арчаков А.И. (2004) Биомед. химия, 50, 367-375.
8. "Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю)", утверждён Решением Комиссии Таможенного союза №299 от 28 мая 2010.
9. Lake B.G. (1987) Biochem. Toxicol.: A Practical Approach. – Oxford, pp. 183-215.
10. Шаранова Н.Э., Торопыгин И.Ю., Хряпова Е.Ю., Васильев А.В., Ганпаров М.М.Г. (2012) Бюлл. экспер. биол. мед., 154(7), 37-40.
11. Шаранова Н.Э., Васильев А.В., Ганпаров М.М.Г. (2012) Бюлл. экспер. биол. мед., 153(2), 158-161.
12. Shim W., Paik M.J., Nguyen D.T., Lee J.K., Lee Y., Kim J.H., Shin E.H., Kang J.S., Jung H.S., Choi S., Park S., Shim J.S., Lee G. (2012) ACS Nano, 9, 7665-7680.
13. Ji C., Kaplowitz N., Lau M.Y., Kao E., Petrovic L.M., Lee A.S. (2011) Hepatology, 54(1), 229-239.
14. Shi J., Karlsson H.L., Johansson K., Gogvadze V., Xiao L., Li J., Burks T., Garcia-Bennett A., Uheida A., Muhammed M., Mathur S., Morgenstern R., Kagan V.E., Fadeel B. (2012) ACS Nano, 6(3), 1925-1938.

Поступила: 20. 06. 2013.

**CHANGES IN PROTEOME PROFILES OF RAT LIVER MICROSOMES
INDUCED BY SILICON DIOXIDE NANOPARTICLES**

*O.N. Tananova¹, E.A. Arianova¹, I.V. Gmoshinskii¹, I.Yu. Toropygin², E.V. Khryapova², N.V. Trusov¹,
S.A. Khotimchenko¹, V.A. Tutel'yan¹*

¹Institute of Nutrition of Russian Academy of Medical Sciences;
2/14 Ust'inskii lane, Moscow, 109240 Russia; tel.: (495) 698-53-68;
e-mail: 2981868@mail.ru; aria-elena@yandex.ru

²Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

The effect of daily intragastric administration of an aqueous dispersion of silicon nanoparticles (NPs) (the dose range from 1.0 mg/kg to 100 mg/kg body weight for 28 days) to rats on the proteomic profile of liver microsomes has been investigated by 2D-electrophoresis followed by subsequent mass spectrometry identification. The liver microsomal fraction was isolated by differential centrifugation and its protein composition was analyzed by 2D-polyacrylamide gel electrophoresis. Identification of protein spots was carried out using MALDI-TOF mass spectrometric analysis. The mass spectrometry analysis revealed the protein GRP78 (78 kD glucose-regulated protein precursor), belonging to the family of heat shock proteins. This protein present in animals of the control group was not detected in NP-treated rats of group 2 (1 mg/kg body weight/day) and group 3 (10 mg/kg body weight/day). This protein predominantly localized in the liver cell endoplasmic reticulum and plasma membrane has the chaperone biological activity. Possible mechanisms of the effects of engineered nanoparticles on biosynthetic processes in the body are discussed.

Key words: silicon dioxide, nanoparticles, rats, two-dimensional electrophoresis, heat shock proteins, GRP78.