

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА, МОДИФИЦИРОВАННЫХ СЕРЕБРЯНЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ В ПРИСУТСТВИИ РЕСВЕРАТРОЛА, КОФЕИНА И ВЕРАПАМИЛА

М.А. Наквасина, В.Г. Артюхов, И.А. Колтаков, В.Е. Пономаренко

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 13.01.2025 г.

Аннотация. Исследованы некоторые маркерные показатели процессов клеточной смерти лимфоцитов крови человека в условиях воздействия серебряных наночастиц сферической формы в отсутствие и в присутствии транс-ресвератрола, кофеина, верапамила. Величины размеров серебряных наночастиц, полученных путем химического синтеза, составили 94 ± 3 нм (89 %) и 13 ± 2 нм (11 %), а дзета-потенциала – $-36,6 \pm 0,6$ мВ. Обнаружено, что серебряные наночастицы индуцируют процессы гибели лимфоцитов крови человека по типу некроза, апоптоза и этоза, сопровождающиеся интенсивным образованием внутриклеточных активных форм кислорода и, в том числе, оксида азота. Преимущественно некротические клетки и внеклеточные ловушки ДНК обнаруживаются в исследуемых образцах через 1 ч после воздействия частиц коллоидного серебра на иммуноциты, а ДНК-кометы – один из маркерных признаков апоптоза – через 3 ч.

Ресвератрол (10^{-5} моль/л), кофеин (10^{-5} моль/л) и верапамил (10^{-4} моль/л) в условиях воздействия наночастиц серебра инициируют повышение уровня жизнеспособности лимфоцитов, снижение продукции внутриклеточных активных форм кислорода и количества некротических клеток по отношению к таковым для иммуноцитов, модифицированных наночастицами в отсутствие этих соединений. Обсуждаются возможные механизмы протекторного эффекта ресвератрола, кофеина и верапамила по отношению к лимфоцитам в условиях воздействия наночастиц серебра. Кофеин и ресвератрол защищают лимфоциты от некроза за счет своих антиоксидантных свойств, а верапамил – путем блокирования кальциевых каналов плазматических мембран и снижения уровня свободного кальция в клетке. Ресвератрол, уменьшая уровень повреждений ДНК, способен снижать интенсивность процессов апоптотической гибели иммуноцитов, модифицированных серебряными наночастицами. Защитное действие ресвератрола по отношению к лимфоцитам может быть связано с его антиокислительными и антиоксидантными свойствами, встраиванием его молекул в лимфоцитарные мембраны и их стабилизацией, взаимодействием (интеркаляцией) с ДНК и снижением уровня ее повреждений. Ресвератрол, кофеин и верапамил могут быть использованы как агенты, защищающие лимфоциты человека от цитотоксического действия серебряных наночастиц.

Ключевые слова: серебряные наночастицы, лимфоциты, некроз, апоптоз, этоз, кофеин, ресвератрол, верапамил

Одной из актуальных проблем бионанотехнологии и наномедицины является изучение механизмов биологического действия неорганических наночастиц, в том числе, серебряных.

Наночастицы серебра (НЧС) проявляют эффективную антимикробную активность в отношении *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и других бактерий, обуслов-

ленную, в первую очередь, разрушением клеточных стенок, генерацией активных форм кислорода, повреждением ДНК [1, 2, 3]. В отличие от распространенной антибиотикорезистентности редко наблюдаемая устойчивость бактерий к НЧС связана с одновременной реализацией множественных антибактериальных механизмов [1, 2]. Серебряные наночастицы обладают противирусным действием в отношении ряда вирусов: иммунодефицита человека, гепатита В, простого гер-

песа, респираторно-синцитиального и некоторых других [1, 4]. Применение НЧС в качестве терапевтических агентов для лечения инфекционных заболеваний человека имеет высокий потенциал как альтернатива традиционным антибактериальным и противовирусным средствам с различными побочными эффектами [1-4]. НЧС активно используют для изготовления раневых повязок, сердечно-сосудистых имплантатов, катетеров, стоматологических композитов [1, 2]. Кроме того, наночастицы серебра проявляют нематоцидную, антигельминтную и антимикотическую виды активности [1-3]. В настоящее время НЧС привлекают внимание исследователей в связи с их противоопухолевыми эффектами: инициацией гибели трансформированных клеток, блокированием инвазии и метастазирования, ингибированием ангиогенеза [1, 5]. Противоопухолевую активность серебряных наночастиц связывают в основном с процессами генерации активных форм кислорода (АФК), повреждением ДНК, инактивацией ферментов, модулированием активности компонентов сигнальных систем клетки [1, 5, 6]. Имеются сведения о проявлении антидиабетических эффектов НЧС [1]. Перспективы биомедицинского применения серебряных наночастиц связаны и с их использованием для биосенсоринга (биовизуализации) и разработки современных диагностических систем [1].

Однако медицинское применение НЧС требует тщательной оценки их потенциальной токсичности [1, 5, 7]. Серебряные наночастицы проявляют цитотоксические эффекты в условиях *in vitro*, зависящие от их размеров, формы, поверхностного заряда, покрытия («короны»), дозы, степени окисления, процессов агломерации и агрегации [5, 8]. НЧС могут активировать гены, связанные с инициацией процессов клеточной гибели: некроза, апоптоза, аутофагии [8, 9]. Обнаружена потенциальная токсичность наночастиц серебра для многих органов и систем (кожи, глаз, печени, дыхательной, нервной, иммунной, выделительной, репродуктивной систем) [1]. К настоящему времени отсутствуют целостные представления о едином токсикологическом механизме действия серебряных наночастиц на клетки, ткани и органы человека.

Особый интерес в этой связи представляют исследования, направленные на изучение влияния серебряных наночастиц на клетки крови человека и, в частности, иммуноциты. Обнаружено [1, 2, 7, 10], что НЧС снижают жизнеспособность лейкоцитов дозозависимым способом, нарушают

структурно-функциональное состояние иммуноцитов, их пролиферацию и продукцию цитокинов, вызывают развитие окислительного стресса, иницируют процессы клеточной гибели. Они могут накапливаться в иммунных органах (лимфатических узлах, селезенке) и модулировать иммунные процессы в организме человека [1].

Ранее нами было выявлено [11], что воздействие наночастиц серебра (2-12 нм) на лимфоциты человека индуцирует по сравнению с контролем снижение уровня жизнеспособности клеток, РНК, активности лактатдегидрогеназы, глутатионредуктазы, цитозольного кальция, повышение количества внутриклеточных активных форм кислорода, изменения поверхностной архитектоники клеток, нарушения степени гидрофобности и зарядового состояния их плазматических мембран. С помощью метода флуоресцентной микроскопии с использованием красителя SYBR GREEN I, связывающегося с двухцепочечной молекулой ДНК, обнаружено [11], что модификация лимфоцитов НЧС вызывает деформацию клеточных ядер, сопровождающуюся выбросом хроматина в среду и образованием внеклеточных ловушек, т.е. процесс этоза. Однако другие типы клеточной гибели иммуноцитов в условиях воздействия серебряных наночастиц не были исследованы. Кроме того, представляется актуальным изучение влияния микроокружения и физиологического состояния клеток-мишеней в условиях воздействия серебряных наночастиц для понимания механизмов их цитотоксичности и разработки способов защиты иммуноцитов от клеточной гибели. Показано [12, 13], что в качестве возможных регуляторов программированной клеточной гибели лимфоцитов, модифицированных УФ-облучением и пероксидом водорода, могут выступать соединения с антиоксидантной активностью – кофеин, генистеин, ресвератрол, а также верапамил – блокатор кальциевых каналов плазматических мембран. Выявлены антиапоптотический и антиоксидантный эффекты кофеина (10^{-4} моль/л) по отношению к лимфоцитам в условиях их УФ-облучения (240-390 нм) в дозе 1510 Дж/м^2 [12]. Верапамил (10^{-4} моль/л) проявлял эффекты снижения уровня активных форм кислорода в фотомодифицированных иммуноцитах [12]. Обнаружено снижение интенсивности процессов апоптотической и некротической гибели лимфоцитов после воздействия УФ-света (254 нм, 1510 Дж/м^2) и пероксида водорода (10^{-5} моль/л) в присутствии ресвератрола (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} моль/л) [13].

В этой связи нами были исследованы некоторые маркерные показатели процессов клеточной смерти лимфоцитов человека в условиях действия серебряных наночастиц в отсутствие и в присутствии транс-ресвератрола, кофеина, верапамила.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования явились лимфоцитарные клетки, полученные из гепаринизированной крови доноров. Лимфоциты получали путем центрифугирования донорской крови в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$).

Коллоидный раствор серебра готовили путем восстановления AgNO_3 гидроксиламином гидроксидом с последующей обработкой в течение 5 мин на ультразвуковом гомогенизаторе Sonicators Q500 («Qsonica», США) при мощности 5 Вт и частоте 22 кГц.

Измерение размеров наночастиц серебра и их дзета-потенциала проводили методом динамического светорассеяния с использованием системы для характеристики наночастиц Zetasizer Nano ZSP («Malvern», Англия).

Электронные спектры поглощения НЧС регистрировали на автоматическом спектрофотометре UV-2401 PC (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 400 до 600 нм.

К суспензиям лимфоцитов ($2 \cdot 10^6$ кл/мл) добавляли растворы верапамила и транс-ресвератрола (Shaanxi Hongao Bio-Tech Inc., Китай, степень очистки 99 %) в концентрации 10^{-3} моль/л, кофеина (10^{-4} моль/л), приготовленные на растворе Хенкса (рН 7,4 при 20°C), в соотношении 1:0,1, инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Далее к суспензии лимфоцитов с ресвератролом, верапамилем и кофеином добавляли коллоидный раствор серебра в соотношении 1:0,1 и инкубировали 1 ч и 3 ч.

Число жизнеспособных клеток во взвесах определяли методом эксклюзии трипанового синего.

Внутриклеточный уровень активных форм кислорода в нативных и модифицированных лимфоцитах исследовали при помощи флуоресцентного зонда 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетата (DCFH-DA). На спектрофлуориметре Shimadzu RF-1501 (Япония) измеряли интенсивность флуоресценции образовавшегося в ходе реакции продукта – DCF (длина волны возбуждения – 480 нм, длина волны эмиссии – 520–521 нм).

Интенсивность образования оксида азота в лимфоцитах оценивали по накоплению нитрит-аниона (NO_2^-) колориметрическим методом, ос-

нованным на реакции Грисса [14]. Содержание NO_2^- определяли по калибровочному графику, для построения которого использовали стандартные растворы NaNO_2 .

Для исследования процесса некроза лимфоциты окрашивали раствором пропидия йодида, который связывается с неповрежденной ДНК и способен проникать в клетки лишь при потере целостности цитоплазматической мембраны. Микроскопические препараты просматривали на флуоресцентном микроскопе Nikon ECLIPSE Ni-E/Ni-U Nikon (Япония).

Исследование изменений структурного состояния ДНК в условиях реализации апоптоза проводили с помощью метода ДНК-комет. Изображения ДНК-комет, полученные на флуоресцентном микроскопе, обрабатывали с помощью специализированного программного обеспечения для расчета стандартных параметров комет CometScoretm.

Обработку результатов экспериментов проводили с помощью пакета программ «Microsoft Office Excel 2019». Количественные показатели описывались с помощью средних арифметических величин и стандартных отклонений. Достоверность отличий контрольных и экспериментальных результатов оценивали при помощи *t*-критерия Стьюдента. Различия тестируемых показателей считались достоверными при $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Величины размеров серебряных наночастиц составили 94 ± 3 нм (89 %) и 13 ± 2 нм (11 %), а дзета-потенциала $-36,6 \pm 0,6$ мВ. По всей вероятности, часть НЧС в исследуемых образцах образует агрегаты или агрегаты, которые тестируются методом динамического светорассеяния как частицы с размерами ~ 100 нм.

Спектр поглощения полученной суспензии наночастиц серебра имеет λ_{max} при 417 нм, а оптическая плотность в максимуме в среднем составляет 0,45. По разным данным [15–17], положение λ_{max} спектров поглощения немодифицированных НЧС варьирует от 380 до 420 нм. Одна полоса поглощения в спектре соответствует сферическим частицам малого размера.

С целью получения информации о возможности реализации некротической гибели лимфоцитов после воздействия НЧС мы провели флуоресцентно-микроскопические исследования клеток после их окрашивания пропидиумом йодидом (рис. 1). Это ДНК-связывающий (интеркалирующий) краситель, который не проникает через плаз-

матические мембраны интактных клеток. Пропидия йодид после связывания с ДНК испускает красную флуоресценцию (максимум поглощения – 535 нм, максимум эмиссии – 615-617 нм). Применение йодистого пропидия, методов флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии позволяет визуализировать ядра мертвых клеток, различать жизнеспособные нативные, некротические и «поздние» апоптотические клетки.

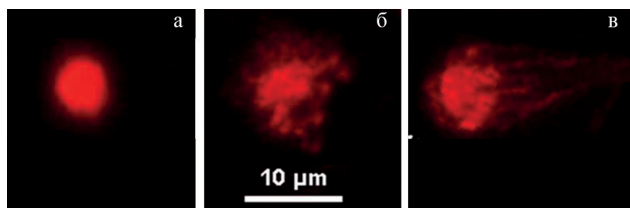


Рис. 1. Флуоресцентно-микроскопические изображения ядер лимфоцитов (а) и внеклеточных ловушек (б, в) через 1 ч после воздействия серебряных наночастиц (окрашивание пропидия йодидом)

Через 1 и 3 ч после инкубации лимфоцитов в присутствии серебряных наночастиц были обнаружены окрашенные пропидия йодидом ядра погибших лимфоцитов (рис. 1, а). В этих же условиях также выявлены отдельные внеклеточные ловушки ДНК (рис. 1, б, в). Следовательно, через 1 и 3 ч после воздействия серебряных наночастиц на лимфоциты осуществляются процессы гибели лимфоцитов по типу некроза и этоза.

С целью выявления возможности осуществления процессов апоптоза лимфоцитов в условиях воздействия серебряных наночастиц мы использовали метод ДНК-комет, который позволяет выявить одно- и двунитевые разрывы ДНК. Кометы интактных лимфоцитов относятся преимущественно к классу С0. Кометы лимфоцитов,

модифицированных серебряными наночастицами в течение 3 ч, относятся к классу С2, однако, в исследуемых образцах обнаруживаются и кометы класса С3. С2-кометы характерны для предапоптотических клеток с фрагментами ДНК ≤ 50 т.п.н. Кометы, входящие в класс С3, соответствуют апоптотическим клеткам с межнуклеосомной фрагментацией ДНК.

Уровень повреждений ДНК, оцениваемый по процентному содержанию ДНК в «хвосте» комет, в интактных клетках через 3 ч после их инкубации в присутствии НЧС составил 70 ± 7 %, а для интактных иммуноцитов – 25 ± 9 %. Этот показатель характеризует уровень одностебельных разрывов в ДНК, наличие которых рассматривают как сигнал к инициации апоптоза.

На основании полученных данных можно заключить, что через 1-3 ч после воздействия на лимфоциты серебряных наночастиц реализуются процессы их гибели по типу некроза, апоптоза и этоза.

С одной стороны, процессы гибели клеток сопровождаются интенсивным образованием АФК, а с другой, повышение внутриклеточного уровня продукции АФК в условиях воздействия наночастиц – один из механизмов их цитотоксической активности.

Нами обнаружено существенное повышение в среднем в 2,5 раза по сравнению с контролем (интактные иммуноциты) уровня внутриклеточных АФК в лимфоцитах после воздействия НЧС (табл. 1).

Действие активных форм кислорода тесно сопряжено с оксидом азота – важнейшим внутри- и межклеточным сигнальным агентом. Регулирующее влияние оксида азота на внутриклеточные процессы осуществляется путем активации растворимой гуанилатциклазы с образованием циклического гуанозинмонофосфата, активирующего

Таблица 1

Изменения уровня жизнеспособности лимфоцитов, внутриклеточных активных форм кислорода, повреждений ДНК и количества некротических клеток, модифицированных воздействием НЧС в отсутствие и в присутствии верапамила, кофеина и ресвератрола

Показатель	Модификаторы				
	- (контроль)	НЧС	Верапамил + НЧС	Кофеин + НЧС	Ресвератрол + НЧС
Уровень жизнеспособности (через 1 ч), %	94 \pm 3	51 \pm 6	64 \pm 5	77 \pm 6	80 \pm 4
Уровень продукции АФК (через 1 ч), отн. ед.	15 \pm 3	38 \pm 10	-	17 \pm 5	19 \pm 7
Количество некротических клеток в поле зрения (через 1 ч)	5 \pm 1	34 \pm 4	20 \pm 4	19 \pm 3	18 \pm 4
Количество некротических клеток в поле зрения (через 3 ч)	9 \pm 2	42 \pm 4	19 \pm 3	14 \pm 5	17 \pm 3
Изменения процентного содержания ДНК в «хвосте» комет (через 3 ч)	25 \pm 9	70 \pm 7	-	-	40 \pm 10

щего цГМФ-зависимую протеинкиназу. Эффекты NO могут быть и цГМФ-независимыми. Оксид азота способен оказывать как про-, так и антиоксидантное, цитопротекторное и цитотоксическое действие в зависимости от его внутриклеточного уровня. Более низкие концентрации монооксида азота способствуют выживанию и пролиферации клеток, а более высокие – приводят к остановке клеточного цикла, апоптозу и старению [18].

Нами обнаружено повышение уровня оксида азота в лимфоцитах до $73,0 \pm 10,0$ и $88,0 \pm 9,0$ нмоль/л соответственно через 2 и 4 ч после воздействия серебряных наночастиц по отношению к таковому для интактных иммунцитов ($2,0 \pm 0,6$ нмоль/л).

По-видимому, повышение уровня NO в лимфоцитах после воздействия НЧС может быть связано с активацией сигнальных путей клеток, приводящей к активации факторов транскрипции (в том числе транскрипционного фактора каппа В), которые запускают экспрессию индуцибельной NO-синтазы (iNOS). Известно [19], что экспрессия iNOS может происходить в любой ядросодержащей клетке. Макрофаги, Т-клетки и другие иммунциты экспрессируют iNOS в ответ на действие бактериальных продуктов или провоспалительных цитокинов (интерлейкина-1, фактора некроза опухоли-альфа, интерферона-гамма). Последние связываются с рецепторами клеточной поверхности и индуцируют экспрессию синтазы оксида азота. Провоспалительные цитокины могут синтезироваться в клетках после воздействия на них наночастиц, инициирующих генерацию АФК [1].

Взаимодействие оксида азота с супероксидным анион-радикалом с образованием пероксинитрита приводит к снижению уровня NO, способного выступать в качестве потенциального антиапоптотического агента, изменению процесса NO-сигнализации, увеличению уровня окислительного и нитрозативного стресса [20]. В результате в условиях действия серебряных наночастиц запускаются процессы гибели лимфоцитов по типу некроза, апоптоза, этоза.

Следующим этапом работы явилось исследование возможности регулирования интенсивности процессов клеточной гибели лимфоцитов в условиях воздействия НЧС в присутствии ресвератрола, кофеина и верапамила. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Обнаружено статистически значимое повышение уровня жизнеспособности лимфоцитов человека, модифицированных серебряными на-

ночастицами в присутствии ресвератрола (10^{-5} моль/л), кофеина (10^{-5} моль/л) и верапамила (10^{-4} моль/л), по сравнению с таковым для клеток в условиях воздействия НЧС (табл. 1).

После воздействия на лимфоциты серебряных наночастиц в присутствии ресвератрола, кофеина и верапамила наблюдалось статистически достоверное снижение продукции активных форм кислорода по отношению к таковому для клеток, модифицированных наночастицами (табл. 1).

Предварительная инкубация лимфоцитов с ресвератролом (10^{-5} моль/л) вызывала статистически достоверное снижение уровня поврежденности ДНК в условиях воздействия НЧС по отношению к величине исследуемого параметра для клеток, модифицированных наночастицами в отсутствие исследуемого соединения (табл. 1).

Кофеин, верапамил и ресвератрол в использованных концентрациях в условиях воздействия НЧС инициировали снижение количества некротических клеток по сравнению с таковым для клеток, обработанных суспензией коллоидного серебра (табл. 1).

После воздействия на интактные лимфоциты кофеина, верапамила, ресвератрола в исследуемых образцах также обнаруживались отдельные некротические клетки, но не внеклеточные ловушки.

После воздействия НЧС на лимфоциты, предварительно модифицированные верапамилем, кофеином, ресвератролом, в образцах также выявлялись некротические клетки. Примечательно, что в присутствии верапамила на микрофотографиях обнаруживались поврежденные клетки с менее объемными («сжатыми») ядрами наряду с ядрами обычных размеров, а в присутствии ресвератрола – деформированные ядра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием методов флуоресценции, ДНК-комет, флуоресцентной и световой микроскопии исследованы процессы гибели лимфоцитов крови человека, индуцированные воздействием серебряных наночастиц сферической формы в присутствии ресвератрола (10^{-5} моль/л), кофеина (10^{-5} моль/л) и верапамила (10^{-4} моль/л). Обнаружено, что серебряные наночастицы индуцируют процессы гибели лимфоцитов по типу некроза, апоптоза и этоза, сопровождающиеся интенсивным образованием внутриклеточных АФК и, в частности, оксида азота. Активные формы кислорода вызывают повреждение ДНК и активацию сигнальных путей с участием p53, АКТ (серин-треонин-протеинкиназа

В), МАРК (митоген-активируемые протеинкиназы), что приводит к инициации апоптоза. Механизмы цитотоксичности серебряных наночастиц могут быть и не связаны с окислительным стрессом, а обусловлены взаимодействием наночастиц с молекулами аминокислот и белков.

Преимущественно некротические клетки и внеклеточные ловушки ДНК обнаруживаются в исследуемых образцах через 1 ч после воздействия коллоидного серебра на иммунциты. Апоптоз, по видимому, является более медленным процессом: ДНК-кометы обнаруживаются через 3 ч.

Предварительная обработка лимфоцитов ресвератролом (10^{-5} моль/л), кофеином (10^{-5} моль/л) и верапамилом (10^{-4} моль/л) индуцирует в условиях воздействия серебряных наночастиц повышение уровня жизнеспособности клеток, снижение продукции внутриклеточных активных форм кислорода и количества некротических лимфоцитов по отношению к таковым для иммунцитов, модифицированных наночастицами в отсутствие этих агентов. Вероятно, кофеин и ресвератрол защищают лимфоциты от некроза за счет своих антиоксидантных свойств, а верапамил – за счет блокирования кальциевых каналов и снижения уровня свободного кальция в клетке, необходимого для активации кальпаинов в процессе некроза.

Ресвератрол, снижая уровень повреждений ДНК, оказывает антиапоптотический эффект на лимфоциты в условиях воздействия НЧС. Защитное действие ресвератрола по отношению к лимфоцитам может быть связано с его антиокислительными и антиоксидантными свойствами, встраиванием его молекул в лимфоцитарные мембраны и их стабилизацией, взаимодействием (интеркаляцией) с ДНК и снижением уровня ее повреждений.

Эксперименты с использованием регуляторов клеточной гибели – кофеина, ресвератрола и верапамила – показали, что процессы гибели лимфоцитов человека, модифицированных серебряными наночастицами, осуществляются с участием активных форм кислорода и ионов кальция.

Следовательно, ресвератрол, кофеин и верапамил могут быть использованы как агенты, защищающие лимфоциты человека от цитотоксического действия серебряных наночастиц.

Полученные результаты необходимо учитывать при обсуждении вопросов, касающихся исследования процессов клеточной гибели лимфоцитов в условиях воздействия серебряных наночастиц и поиска способов их регулирования,

а также при биомедицинском применении этого типа неорганических наночастиц.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Silver nanoparticles: synthesis, medical applications and biosafety / L. Xu, Y.-Y. Wang, J. Huang, C.-Y. Chen, Z.-X. Wang, H. Xie // *Theranostics*. – 2020. – Vol. 10. – № 20. – P. 8996-9031.
2. Toxicological aspects, safety assessment, and green toxicology of silver nanoparticles (AgNPs) – critical review: state of the art / M. Noga, J. Milan, A. Frydrych, K. Jurowski // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 6. – P. 5133.
3. Biogenic silver nanoparticles: synthesis and application as antibacterial and antifungal agents / A. Rozhin, S. Batasheva, M. Kruychkova, J. Cherednichenko, E. Rozhina, R. Fakhrullin // *Micromachines*. – 2021. – Vol. 12. – № 12. – P. 1480.
4. Genotoxicity of silver nanoparticles / A. Rodrigues-Garraus, A. Azqueta, A. Vettorazzi, A. Lopez de Cerain // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10. – № 2. – P. 251.
5. Наночастицы серебра – цитотоксическая активность и механизм действия / Д.Б. Корман, Л.А. Островская, Н.В. Блюхтерова, В.А. Рыкова, М.М. Фомина // *Биофизика*. – 2022. – Т. 67, № 4. – С.715-727.
6. Nie P. Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: a review / P. Nie, Y. Zhao, H. Xu // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2023. – Vol. 253. – № 8. – P. 114636.
7. Mikhailova E.O. Green silver nanoparticles: an antibacterial mechanism / E.O. Mikhailova // *Antibiotics*. 2025. – Vol. 14. – № 1. – P. 5.
8. Ferdous Z. Health impact of silver nanoparticles: a review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure / Z. Ferdous, A. Nemmar // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 7. – P. 2375.
9. Talarska P. Current knowledge of silver and gold nanoparticles in laboratory research-application, toxicity, cellular uptake / P. Talarska, M. Boruckowski, J. Zurawski // *Nanomaterials*. – 2021. – Vol. 11. – № 9. – P. 2454.
10. Наночастицы серебра индуцируют процессы перекисного окисления липидов и морфологические изменения поверхности лимфоци-

тов человека / Е.В. Жорник, Л.А. Баранова, Е.С. Дрозд, М.С. Судас, Н.Х. Тьяу, Н.К. Быгу, Ч.Т.Н. Зунг, С.А. Чижик, И.Д. Волотовский // Биофизика. – 2014. – Т. 59, № 3. – С. 466-473.

11. Наквасина М.А. Наночастицы серебра индуцируют процессы изменения структурно-функциональных характеристик лимфоцитов человека / М.А. Наквасина, И.А. Колтаков, В.Г. Артюхов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 170. – № 10. – С. 515-521.

12. Antiapoptotic effects of caffeine, genistein, and verapamil in relation to UV-irradiated lymphocyte cells / М.А. Nakvasina, E.V. Tokmakova, I.A. Koltakov, V.G. Artyukhov // Biology Bulletin. – 2020. – Vol. 47. – № 11. – P. 1547-1551.

13. Цитопротекторное и антиоксидантное действие ресвератрола на лимфоциты человека, модифицированные пероксидом водорода и УФ-светом / М.А. Наквасина, В.Г. Артюхов, Е.Н. Чурсанова, О.В. Мячина, Е.И. Корпусова, А.Ю. Деенкова, В.А. Шестых // Биофизика. – 2024. – Т. 69. – № 6. – С. 1185-1194.

14. Bryan N.S. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples / N.S. Bryan, M. B. Grisham // Free radical biology and medicine. – 2007. – Vol. 43. – № 5. – P. 645-657.

15. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы / Ю.А. Крутяков, А.А.

Кудринский, А.Ю. Оленин, Г.В. Лисичкин // Успехи химии. – 2008. – Т. 77. – № 3. – С. 242-269.

16. Сравнительный анализ оптических спектров плазмонных наночастиц различной геометрической формы / А.В. Мекшун, С.С. Моритака, А.Д. Кондорский, В.С. Лебедев / Краткие сообщения по физике ФИАН. – 2020. – № 9. – С. 34-40.

17. Антибактериальные и физико-химические свойства наночастиц серебра и оксида цинка / Р.И. Довнар, С.М. Смотров, С.С. Ануфрик, Т.Н. Соколова, С.Н. Анучин, Н.Н. Иоскевич / Journal of the Grodno State Medical University. – 2022. – Vol. 20. – № 1. – P. 98-107.

18. Внутриклеточные газовые посредники – оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода – участвуют в регуляции апоптоза / Н.В. Рязанцева, Е.Г. Старикова, Л.А. Таширева, Е.А. Степовая, Ю.В. Стариков, И.А. Осихов, В.В. Новицкий // Цитология. – 2012. – Т. 54, № 2. – С. 105-111.

19. Lundberg J.O. Nitric oxide signaling in health and disease / J.O. Lundberg, E. Weitzberg // Cell. – 2022. – Vol. 185. – № 16. – P. 2853-2878.

20. Жигачева И. В. Сигнальные функции оксида азота / И. В. Жигачева, С. В. Васильева // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. – 2018. – Т. 3. – № 2. – С. 64-68.

Воронежский государственный университет
Наквасина Марина Александровна, доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: nakvasina_ma@mail.ru

Артюхов Валерий Григорьевич, доктор биологических наук, Заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Колтаков Игорь Александрович, кандидат биологических наук, доцент кафедры биофизики и биотехнологии
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

Пonomarenko Валерия Евгеньевна, студентка кафедры биофизики и биотехнологии

Voronezh State University
Nakvasina Marina A., PhD., DSci., Full Professor of the Department of Biophysics and Biotechnology
E-mail: nakvasina_ma@mail.ru

Artyukhov Valery G., PhD., DSci., Honored Scientist of the Russian Federation, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology,
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Koltakov Igor A., PhD., Associate Professor of the Department of Biophysics and Biotechnology,
E-mail: koltakov@bio.vsu.ru

Ponomarenko Valeria E., Student of the Department of Biophysics and Biotechnology

INVESTIGATION OF THE PROCESSES OF CELL DEATH OF HUMAN LYMPHOCYTES MODIFIED WITH SILVER NANOPARTICLES IN THE PRESENCE OF RESVERATROL, CAFFEINE AND VERAPAMIL

M.A. Nakvasina, V.G. Artyukhov, I.A. Koltakov, V.E. Ponomarenko

Voronezh State University

Abstract. Some marker indicators of cell death processes in human blood lymphocytes were studied under the action of spherical silver nanoparticles in the absence and presence of trans-resveratrol, caffeine, and verapamil. The sizes of silver nanoparticles obtained by chemical synthesis were 94 ± 3 nm (89%) and 13 ± 2 nm (11%), and the zeta potential was -36.6 ± 0.6 mV. It has been discovered that silver nanoparticles induce processes of death of human blood lymphocytes by the type of necrosis, apoptosis and ethosis, accompanied by intensive formation of intracellular active forms of oxygen and, including, nitric oxide. Predominantly necrotic cells and extracellular DNA traps are detected in the studied samples 1 hour after the effect of colloidal silver on immunocytes, and DNA comets – one of the marker signs of apoptosis – after 3 hours.

Resveratrol (10^{-5} mol/l), caffeine (10^{-5} mol/l) and verapamil (10^{-4} mol/l) under the influence of silver nanoparticles initiate an increase in the level of lymphocyte viability, a decrease in the production of intracellular active oxygen species and the number of necrotic cells in relation to those for immunocytes modified with nanoparticles in the absence of these compounds. Possible mechanisms of the protective effect of resveratrol, caffeine and verapamil on lymphocytes under the influence of silver nanoparticles are discussed. Caffeine and resveratrol protect lymphocytes from necrosis due to their antioxidant properties, and verapamil does so by blocking calcium channels in plasma membranes and reducing the level of free calcium in the cell. Resveratrol, by reducing the level of DNA damage, is able to reduce the intensity of apoptotic death processes in immunocytes modified with silver nanoparticles. The protective effect of resveratrol on lymphocytes may be associated with its antioxidant and antioxidant properties, the incorporation of its molecules into lymphocyte membranes and their stabilization, interaction (intercalation) with DNA and a reduction in the level of its damage. Resveratrol, caffeine and verapamil can be used as agents that protect human lymphocytes from the cytotoxic effects of silver nanoparticles.

Keywords: silver nanoparticles, lymphocytes, necrosis, apoptosis, ethosis, caffeine, resveratrol, verapamil

REFERENCES

1. Silver nanoparticles: synthesis, medical applications and biosafety / L. Xu, Y.-Y. Wang, J. Huang, C.-Y. Chen, Z.-X. Wang, H. Xie // *Theranostics*. – 2020. – Vol. 10. – № 20. – P. 8996-9031. DOI: 10.7150/thno.45413
2. Toxicological aspects, safety assessment, and green toxicology of silver nanoparticles (AgNPs) – critical review: state of the art / M. Noga, J. Milan, A. Frydrych, K. Jurowski // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – № 6. – P. 5133. DOI: 10.3390/ijms24065133
3. Biogenic silver nanoparticles: synthesis and application as antibacterial and antifungal agents / A. Rozhin, S. Batasheva, M. Kruychkova, J. Cherednichenko, E. Rozhina, R. Fakhruллин // *Micromachines*. – 2021. – Vol. 12. – № 12. – P. 1480. DOI: 10.3390/mi12121480
4. Genotoxicity of silver nanoparticles / A. Rodrigues-Garraus, A. Azqueta, A. Vettorazzi, A. Lopez de Cerain // *Nanomaterials*. – 2020. – Vol. 10. – № 2. – P. 251. DOI: 10.3390/nano10020251
5. Silver nanoparticles – cytotoxic activity and mechanism of action / D.B. Korman, L.A. Ostrovskaya, N.V. Blyuhterova, V.A. Rykova, M.M. Fomina // *Biophysics*. – 2022. – Vol. 67, № 4. – pp.715-727. DOI: 10.31857/S000630292204010X
6. Nie P. Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: a review / P. Nie, Y. Zhao, H. Xu // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2023. – Vol. 253. – № 8. – P. 114636. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.114636
7. Mikhailova E.O. Green silver nanoparticles: an antibacterial mechanism / E.O. Mikhailova // *Antibiotics*. 2025. – Vol. 14. – № 1. – P. 5. DOI: 10.3390/antibiotics14010005

8. Ferdous Z. Health impact of silver nanoparticles: a review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure / Z. Ferdous, A. Nemmar // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 7. – P. 2375. DOI: 10.3390/ijms21072375
9. Talarska P. Current knowledge of silver and gold nanoparticles in laboratory research-application, toxicity, cellular uptake / P. Talarska, M. Borucki, J. Zurawski // *Nanomaterials*. – 2021. – Vol. 11. – № 9. – P. 2454. DOI: 10.3390/nano11092454
10. Nanochasticy serebra induciruyut processy perekisnogo okisleniya lipidov i morfologicheskie izmeneniya poverhnosti limfocitov cheloveka / E.V. Zhornik, L.A. Baranova, E.S. Drozd, M.S. Sudas, N.H. Tyau, N.K. Byu, Ch.T.N. Zung, S.A. Chizhik, I.D. Volotovskij // *Biofizika*. – 2014. – T. 59, № 3. – S. 466-473.
11. Nakvasina M.A. Nanochasticy serebra induciruyut processy izmeneniya strukturno-funkcional'nykh harakteristik limfocitov cheloveka / M.A. Nakvasina, I.A. Koltakov, V.G. Artyukhov // *Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny*. – 2020. – T. 170. – № 10. – S. 515-521. DOI: 10.47056/0365-9615-2020-170-10-515-521
12. Antiapoptotic effects of caffeine, genistein, and verapamil in relation to UV-irradiated lymphocyte cells / M.A. Nakvasina, E.V. Tokmakova, I.A. Koltakov, V.G. Artyukhov // *Biology Bulletin*. – 2020. – Vol. 47. – № 11. – P. 1547-1551. DOI: 10.1134/S1062359020110114
13. Citoprotektoynoe i antioksidantnoe dejstvie resveratrola na limfocity cheloveka, modifitsirovannyye peroksidom vodoroda i UF-svetom / M.A. Nakvasina, V.G. Artyukhov, E.N. Chursanova, O.V. Myachina, E.I. Korpusova, A.Yu. Deenkova, V.A. Shestyh // *Biofizika*. – 2024. – T. 69. – № 6. – S. 1185-1194. DOI: 10.31857/S000630292400056
14. Bryan N.S. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples / N.S. Bryan, M. B. Grisham // *Free radical biology and medicine*. – 2007. – Vol. 43. – № 5. – P. 645-657. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026
15. Sintez i svoystva nanochasticheskogo serebra: dostizheniya i perspektivy / Yu.A. Krutyakov, A.A. Kudrinskij, A.Yu. Olenin, G.V. Lisichkin // *Uspekhi himii*. – 2008. – T. 77. – № 3. – S. 242-269.
16. Sravnitel'nyj analiz opticheskikh spektrov plazmonnykh nanochasticheskikh razlichnoj geometricheskoy formy / A.V. Mekshun, S.S. Moritaka, A.D. Kondorskij, V.S. Lebedev // *Kratkie soobshcheniya po fizike FIAN*. – 2020. – № 9. – S. 34-40.
17. Antibakterial'nye i fiziko-himicheskie svoystva nanochasticheskogo serebra i oksida cinka / R.I. Dovnar, S.M. Smotrin, S.S. Anufrik, T.N. Sokolova, S.N. Anuchin, N.N. Ioskevich // *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. – 2022. – T. 20. – № 1. – S. 98-107. DOI: 10.25298/2221-8785-2022-20-1-98-107
18. Vnutrikletochnye gazovyye posredniki – oksid azota, monooksid ugleroda i sulfid vodoroda – uchastvuyut v regulyatsii apoptoza / N.V. Ryazanceva, E.G. Starikova, L.A. Tashireva, E.A. Stepovaya, Yu.V. Starikov, I.A. Osihov, V.V. Novickij // *Citologiya*. – 2012. – T. 54, № 2. – S. 105-111.
19. Lundberg J.O. Nitric oxide signaling in health and disease / J.O. Lundberg, E. Weitzberg // *Cell*. – 2022. – Vol. 185. – № 16. – P. 2853-2878. DOI: 10.1016/j.cell.2022.06.010
20. Zhigacheva I. V. Signal'nye funktsii oksida azota / I. V. Zhigacheva, S. V. Vasil'eva // *Informatsionnye tekhnologii v medicine, biologii, farmakologii i ekologii*. – 2018. – T. 3. – № 2. – S. 64-68.