

# ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 576.32/36

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ С АПКОНВЕРСИОННЫМИ НАНОЧАСТИЦАМИ В РАЗЛИЧНЫХ МАТРИЦАХ

С.Н. Плескова, Е.Н. Горшкова, Е.Е. Пудовкина

*Научно-образовательный центр «Физика твердотельных наноструктур»  
Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского*

В работе определены  $LD_{50}$  для апконверсионных наночастиц с флуоресцентным центром Er/Yb и выявлено, что наиболее безопасными являются наночастицы в матрице из биогенного материала витлокита, в то время как соотношение флуоресцирующих редкоземельных элементов мало влияет на токсичность наноматериала. Выявлено, что нейтрофилы в процессе взаимодействия с апконверсионными наночастицами погибают по механизму некроза, а энергетический потенциал клетки остается невосстановленным, поскольку уровень гликогена в процессе взаимодействия с наночастицами не изменяется.

**Ключевые слова:** нейтрофильные гранулоциты, апконверсионные наночастицы, некроз, гликоген,  $LD_{50}$ .

**Введение.** У большинства наноматериалов, которые тестируются в настоящее время для медико-биологического применения (квантовых точек, нанотрубок и др.), зафиксирован высокий уровень токсичности [4–6]. Вместе с тем использование наночастиц как для создания диагностических систем *in vitro*, так и для транспортных и терапевтических систем *in vivo* обязательно сопровождается исследованием их биосовместимости и степени клеточной и тканевой альтерации в результате взаимодействия. Важной задачей в процессе таких исследований является определение  $LD_{50}$ , поскольку этот критерий является интегральным показателем, позволяющим сравнивать безопасность или токсичность наноматериалов разной физико-химической природы. Использование наночастиц позволяет в целом уменьшить затратность систем тестирования, поскольку исследования токсичности могут проводиться не на организменном, а на клеточном уровне.

**Цель исследования.** Определение  $LD_{50}$  для новых видов наноразмерных флюорофоров, обладающих свойством апконверсии, установление степени альтерации клеток в зависимости от матрицы, в которую заключены флуоресцирующие кластеры, и выявление морфологических изменений нейтрофильных гранулоцитов, возникающих при взаимодействии с наноматериалом.

**Материалы и методы.** Нейтрофильные гранулоциты выделяли из крови здоровых доноров, стабилизированной гепарином (5 ЕД) на двойном градиенте плотности фиколлаверографина по методике [1].

На нейтрофильных гранулоцитах тестировали наноразмерные флюорофоры двух типов: 1) наночастицы на основе фторидных соединений  $F_3:Er/Yb$  (патент РФ № 2174173), пики флуоресценции – 525, 553 и 672 нм при возбуждении в ИК-диапазоне, размер частиц –  $82,2 \pm 21,8$  нм; 2) наночастицы, полученные из фосфатов со структурой биогенного минерала витлокита на основе соединения

в-Са<sub>3</sub>(РО<sub>4</sub>)<sub>2</sub> и лантаноидов Er и Yb (в соотношениях Er/Yb=0,17 и Er/Yb=0,1) (синтезированы на химическом факультете ННГУ им. Н.И. Лобачевского под руководством д.х.н., проф. А.И. Орловой), пики флуоресценции – 525, 550, 650 нм при возбуждении в ИК-диапазоне, размер частиц – 57,1±17,9 нм.

Суспензию, содержащую наночастицы, помещали в ультразвуковую ванну (РОЛТЭК, Москва) на 15 мин, после чего разводили до необходимой концентрации и инкубировали с нейтрофилами (37°, 30 мин).

Число живых клеток к началу эксперимента по тесту с пропидиумом йодидом составляло не менее 99 %. Жизнеспособность клеток в контроле и после воздействия наночастиц оценивалась по результатам окраски пропидиумом йодидом (Sigma, США). Для окрашивания клетки фиксировали на подложке этиловым спиртом (70 %, 10 мин), затем отмывали и окрашивали 0,025 % раствором пропидиума йодида. После пятикратного отмывания учитывали процент окрашенных (погибших) из 100 просмотренных клеток. Строили кривую жизнеспособности нейтрофильных гранулоцитов в зависимости от концентрации наночастиц. Кроме того, экспериментальные данные по выживаемости клеток использованы для определения LD<sub>50</sub> с помощью пробит-анализа. В пробит-анализе предполагается, что зависимая переменная Y может принимать только два значения – 0 и 1. Вероятность того, что Y=1, определяется нормальным распределением. Принимали

$$x = \lg(d),$$

где  $x$  – количественный признак,  $Y$  – бинарный отклик,  $d$  – доза.

Модель после логарифмирования выглядела так:

$$p(x) = \phi(a + bx),$$

$$p(x) = 50\%,$$

$$x(50) = \frac{1/\phi(50) \cdot a}{b} = \frac{q(50) \cdot a}{b},$$

где  $p$  – пробит, вероятность  $P [Y(x)=1]$ ,  $\phi$  – интегральная функция стандартного нор-

мального распределения,  $a, b$  – экспериментальные значения,  $q(50)$  – квантиль уровня 0,5 нормального распределения.

Эта формула сводится к:

$$x(50) = \frac{a}{b},$$

а с учетом логарифмических преобразований

$$LD_{50} = d(50) = \frac{t}{b},$$

где  $t$  – время воздействия токсиканта.

Изменение морфологии нейтрофильных гранулоцитов оценивали микроскопически (Olympus IX71, Япония) при увеличении  $\times 60$ .

Для определения уровня гликогена в нейтрофилах использовали PAS-реакцию, метод [3]. Внутриклеточный уровень гликогена оценивали по величине среднего цитохимического коэффициента (СЦК), вычисляемого по формуле:

$$\text{СЦК} = \frac{0a + 1b + 2c + 3d}{100} \text{ (отн. ед.)},$$

где  $a, b, c, d$  – количество клеток с определенной степенью включения красно-коричневых гранул, а цифры показывают степень выраженности окраски:

0 – отсутствие окрашивания;

1 – наличие в цитоплазме единичных окрашенных гранул;

2 – цитоплазма содержит 50–70 % площади красно-коричневых гранул;

3 – цитоплазма полностью заполнена красно-коричневыми гранулами.

Статистический анализ проводили в пакете Origin 5,0 Server.

**Результаты и обсуждение.** Инкубация нейтрофилов с апконверсионными наночастицами (АК-НЧ) в высокой концентрации ( $5 \cdot 10^{-3}$  М) привела к тому, что уже после 30 мин наблюдалась 100 % гибель клеток, что выявлялось по яркому свечению PI в области ядра для всех клеток в поле зрения микроскопа. На основании результатов взаимодействия флуоресцентных наночастиц с нейтрофилами (37 °С, 30 мин) были определены LD<sub>50</sub> графическим методом и с помощью пробит-анализа. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Медиальные летальные дозы (LD<sub>50</sub>)  
для разных видов апконверсионных наночастиц**

Тип АК-НЧ	F <sub>3</sub> :Er/Yb	v-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> :Er <sup>3+</sup> ,Yb <sup>3+</sup> (Er/Yb=0,17)	v-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> :Er <sup>3+</sup> ,Yb <sup>3+</sup> (Er/Yb=0,1)
LD <sub>50</sub> (M), пробит-анализ	7,68·10 <sup>-6</sup>	3,31·10 <sup>-4</sup>	3,25·10 <sup>-4</sup>
LD <sub>50</sub> (M), экстраполяция кривой	5,75·10 <sup>-6</sup>	2,86·10 <sup>-4</sup>	1,25·10 <sup>-4</sup>

Представленные результаты позволяют сделать несколько практически важных выводов. Во-первых, несмотря на то, что порядок цифр при определении LD<sub>50</sub> один и тот же, но точные значения медиальных летальных доз несколько отличаются, поэтому при определении LD<sub>50</sub> для наночастиц необходимо пользоваться несколькими методами. Во-вторых, наиболее токсичными являются апконверсионные наночастицы, заключенные во фторидную матрицу: даже в малых дозах они вызывают массовую гибель клеток, а следовательно, такие частицы не могут быть использованы для живых систем, но на их основе можно исследовать механизмы альтерации клеток наноразмерными флюорофора-

ми. В-третьих, наименее токсичными являются наночастицы в матрице из биогенного минерала витлокита, а поскольку при разном соотношении редкоземельных элементов (Er и Yb) во флуоресцентном центре LD<sub>50</sub> практически не изменяется, то, следовательно, на токсичность наноматериалов гораздо большее влияние оказывает состав матрицы, нежели количество и соотношение редкоземельных элементов.

Микроскопически обнаруживалось поглощение апконверсионных наночастиц нейтрофильными гранулоцитами, о чем свидетельствовало наличие локальных внутриклеточных включений (рис. 1, 2).



**Рис. 1.** Нейтрофилы после инкубации (30 мин, 37 °С) с апконверсионными наночастицами вида F<sub>3</sub>:Er/Yb (8,25·10<sup>-7</sup> M). Эффект блеббинга цитоплазматической мембраны, сопровождающий гибель клетки по механизму некроза. Изображение получено с использованием оптического микроскопа Olympus IX71, увеличение ×60

Все три вида исследованных АК-НЧ вызвали изменения в морфологии нейтрофилов. Для нейтрофилов, проинкубированных с наиболее токсичными наночастицами вида  $F_3:Er/Yb$ , был зафиксирован эффект блеббинга (рис. 1). Вероятнее всего этот процесс можно объяснить окислительным стрессом, который обычно является одним из основных альтерационных механизмов воздействия наночастиц [7, 8]. Некроз, являющийся заклю-

чительным этапом блеббинга, обусловлен, прежде всего, альтерацией цитоскелета, связанной с повреждением F-актина [2].

Для нейтрофилов, проинкубированных с апконверсионными наночастицами вида  $\beta-Ca_3(PO_4)_2:Er^{3+}, Yb^{3+}$  (матрица витлокита), не были зафиксированы выраженные изменения в морфологии, однако отмечалось активное образование псевдоподий (рис. 2).



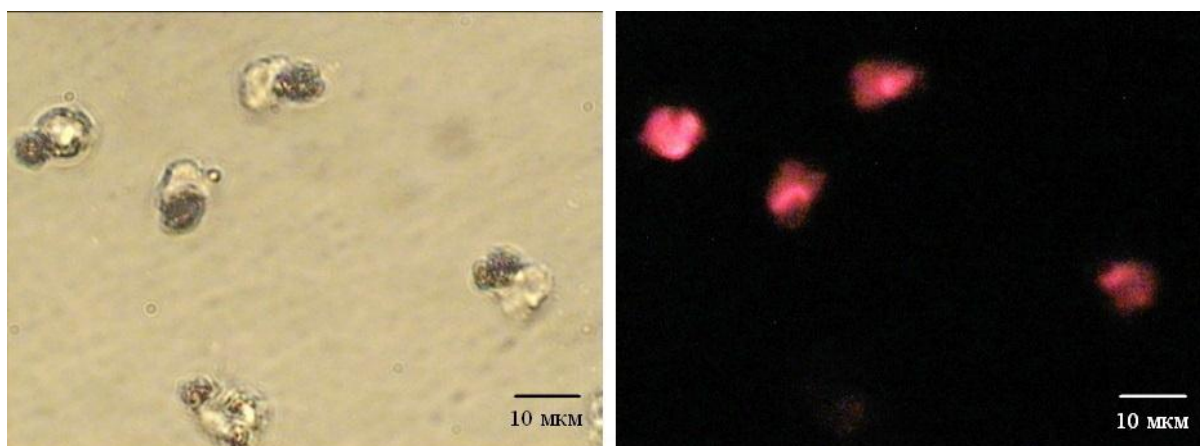
**Рис. 2.** Нейтрофилы после инкубации (30 мин, 37 °С) с апконверсионными наночастицами вида  $\beta-Ca_3(PO_4)_2:Er^{3+}, Yb^{3+}$  ( $Er/Yb=0,17$ ) ( $10^{-4}$  М). Клетки незначительно изменяют морфологию, нейтрофил, поглотивший максимальное количество наноматериалов, образует псевдоподии. Изображение получено с помощью оптического микроскопа Olympus IX71, увеличение  $\times 60$

Увеличение концентрации флуоресцентных наночастиц в витлокитовой матрице также вызывало гибель клеток. Некроз отмечался прежде всего для нейтрофилов, характеризовавшихся наибольшим количеством включений агрегатов в цитоплазме (рис. 3). Для них было зафиксировано более интенсивное локальное свечение PI. В целом, нужно отметить, что если при добавлении суспензии наноматериалов они не визуализировались ни в обычном свете, ни после возбуждения инфракрасным лазером, то их совместная инкубация с нейтрофильными гранулоцитами сопровождалась выраженной агрегацией наночастиц. Образованные крупные аг-

регаты четко визуализировались внутри фагоцитов.

Было проведено исследование содержания гликогена для определения наличия или отсутствия расходования энергетических субстратов в процессе взаимодействия с наноматериалами. Для определения внутриклеточного запаса гликогена была использована PAS-реакция. Результаты представлены в табл. 2.

Причиной того, что энергетические запасы клеток не использовались, могло быть угнетение физиологических процессов либо блокирование активности внутриклеточных ферментов.



**Рис. 3.** Нейтрофилы (фиксация этанолом) после инкубации (30 мин, 37 °С) с АК-НЧ  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2:\text{Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$  ( $\text{Er}/\text{Yb}=0,1$ ): слева – в режиме подсветки без фильтра, справа – свечение пропидиума йодида при возбуждении ртутной лампой, использован светофильтр U-MNG2. Изображения получены на оптическом микроскопе Olympus IX71, увеличение объектива  $\times 60$

Таблица 2

**Средний цитохимический коэффициент  
внутриклеточного гликогена нейтрофильных гранулоцитов  
после инкубации (37 °С, 30 мин) с апконверсионными наночастицами типа  $\text{F}_3:\text{Er}/\text{Yb}$**

Контроль	АК-НЧ ( $8,25 \cdot 10^{-5}$ мМ)	АК-НЧ ( $1 \cdot 10^{-3}$ мМ)
1,08 $\pm$ 0,36	1,20 $\pm$ 0,37 ( $t=1,34$ ; $n=44$ ; $p=0,19$ )	1,65 $\pm$ 0,71* ( $t=4,12$ ; $n=48$ ; $p=0,0002$ )

**Примечание.** \*– различия с контролем статистически значимы ( $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Таким образом, инкубация нейтрофильных гранулоцитов с апконверсионными наночастицами разного состава приводит к гибели клеток. В случае использования наноматериалов во фторидной матрице основным механизмом клеточной гибели является некроз, который начинается с блеббинга. Учитывая высокий цитотоксический потенциал нейтрофила, высвобождающийся при некротической гибели клеток, можно сделать вывод о том, что при взаимодействии нейтрофилов с флуоресцентными наночастицами происходит срыв гомеостатических реакций клеток и такого рода взаимодействие небезопасно для окружающих тканей. Данные исследования медиальных летальных доз дают отчетливое представление о том, что границы резистентности клеток к воздействию апконверсионных наночастиц полностью обусловлены составом матрицы, поскольку

фторсодержащая матрица вызывает гибель клеток даже при очень низкой концентрации наноматериала, тогда как замена матрицы на биогенный витлокит способствует выживанию клеток даже при достаточно высоких концентрациях наноматериала. Вместе с тем изменение соотношения и концентрации ионов лантаноидов Er и Yb в составе наночастиц практически не изменяет жизнеспособности клеток. При воздействии на нейтрофилы субтоксических доз наноматериалов происходит блокировка энергетического потенциала клетки, поскольку уровень гликогена не изменяется.

*Авторы выражают искреннюю признательность профессору, д.х.н. Альбине Ивановне Орловой и к.х.н. Антону Евгеньевичу Канунову за синтез апконверсионных наночастиц в матрице витлокита.*

1. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов / И. С. Подосинников [и др.] // Лабораторное дело. – 1981. – № 8. – С. 468–470.
2. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury / D. B. Hinshaw [et al.] // Am. J. Pathol. – 1986. – Vol. 123 (3). – P. 454–464.
3. *McManus J. F. A.* Histological demonstration of mucin after periodic acid / J. F. A. McManus // Nature. – 1946. – Vol. 158. – P. 202.
4. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent / S. K. Sohaebuddin [et al.] // Part. Fibre. Toxicol. – 2010. – Vol. 7.
5. Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body / H. S. Choi [et al.]

// Nat. Biotechnol. – 2010. – Vol. 28 (12). – P. 1300–1303.

6. Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks / H. W. Lam [et al.] // Critical Reviews in Toxicology. – 2006. – Vol. 36 (3) – P. 189–217.
7. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines / D. M. Brown [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2001. – Vol. 15 (3). – P. 191–199.
8. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage / N. Li [et al.] // Environ. Health Perspect. – 2003. – Vol. 111 (4). – P. 455–460.

## INTERACTION BETWEEN NEUTROPHIL GRANULOCYTES AND UP-CONVERSIONAL NANOPARTICLES IN THE DIFFERENT MATRIX

S.N. Pleskova, E.N. Gorshkova, E.E. Pudovkina

*Research and Education Center of Physics of Solid State Nanostructures  
of Lobachevsky Nizhny Novgorod State University*

The LD<sub>50</sub> for up-conversional nanoparticles with fluorescent core Er/Yb were founded. The nanoparticles in the matrix of biogenic mineral of vitlocit are the most harmless was established. The ratio of Er and Yb has a little influence on the toxically effect of nanoparticles. The neutrophil granulocytes after interaction with up-conversional nanoparticles died by mechanism of necrosis and the energy potential of the cells remains unclaimed, as the level of glycogen after interaction with nanoparticles is not changed were established.

**Keywords:** neutrophil granulocytes, up-conversional nanoparticles, necrosis, glycogen, LD<sub>50</sub>.