BIOLOGICAL SCIENCES

УДК 576.32/.34:549.211:612.112.3:57.085.23

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОТРОПНОСТИ И МЕХАНИЗМОВ ЭНДОЦИТОЗА ЧАСТИЦ НАНОАЛМАЗОВ МАКРОФАГАМИ IN VITRO

¹Нещадим Д.В., ^{1,2}Архипов С.А., ^{1,2}Шкурупий В.А., ¹Ахраменко Е.С., ¹Троицкий А.В., ²Айдагулова С.В., ³Шестопалова Л.В.

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», Новосибирск, e-mail: arkhipov@centercem.ru; ²Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск; ³Новосибирский государственный университет, Новосибирск

Исследовали in vitro методами световой, флуоресцентной и электронной микроскопии закономерности захвата и накопления наноразмерных частиц (4–6 нм) синтетических алмазов (марки «УДА-В-ГО») в макрофагах. Установлено, что количество частиц наноалмазов (НА) в макрофагах возрастает с увеличением времени инкубирования макрофагов с частицами НА. При этом выявлено, что количество НА в макрофагах достигает некоторого максимума через 24 часа культивирования. Обнаружено, что захват in vitro частиц НА макрофагами может осуществляться одновременно при помощи различных механизмов эндоцитоза: пиноцитозом питательной среды, содержащей отдельные НА и их небольшие агрегаты НА (50-100 нм); эндоцитозом крупных агрегатов НА (более 100 нм); эндоцитозом с формированием клатриновых эндоцитозных везикул с НА (в размерном диапазоне 5–10 нм).

Ключевые слова: наноалмазы, макрофаги, способы эндоцитоза, клатриновые визикулы, in vitro

STUDY OF BIOTROPIC EFFECTS AND MECHANISMS OF ENDOCYTOSIS OF NANODIAMOND PARTICLES BY MACROPHAGES IN VITRO ¹Neshchadim D.V., ^{1,2}Arkhipov S.A., ^{1,2}Shkurupy V.A., ¹Akhramenko E.S., ¹Troitsky A.V., ²Aidagulova S.V., ³Shestopalova L.V.

¹Research Institute of Experimental and Clinical Medicine», Novosibirsk, e-mail: arkhipov@centercem.ru; ²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk; ³Novovosibirsky State University, Novosibirsk

Investigated in vitro by the methods of light, fluorescent and electron microscopy examined patterns of capture and accumulation of nano-sized particles (4–6 nm) of synthetic diamonds (mark «UDD-W-HO») in macrophages. Found that the amount of nanodiamond particles (ND) within macrophages increases with incubation time with particles on macrophages. In this revealed that the amount of ND in the macrophages reaches a maximum at 24 hours of culture. It was found that the capture of particles in vitro ND by macrophages can be done simultaneously through different mechanisms endocytosis: pinocytosis by active nutrient medium containing separate ND and ND aggregates are small (50–100 nm); endocytosis of large aggregates ND (100 nm); endocytosis with the formation of clathrin-coated endocytic vesicles of endocytic ND (in the size range 5–10 nm).

Keywords: nanodiamonds, macrophages, pathway of endocytosis, clathrin-coated vesicles, in vitro

В настоящее время в различных отраслях промышленности и науки используют множество наноразмерных искусственно созданных материалов, в том числе, и наноразмерные алмазы (НА) [7, 8]. В медицине олним из важнейших свойств наноматериалов для их широкого использования в фармации и медицинской практике как с позиции биобезопасности, так и сопряженной с нею вероятности проявлений различного рода эффектов, являются их биосовместимость и биотропность [2, 3, 6]. Проблема биотропности сопряжена с механизмами интернализации изучаемых объектов корпускулярной природы, но интернализация НА частиц в литературе оснащены недостаточно хорошо, имея ввиду их разнообразие и клеток-акцепторов [5, 7]. Ряд исследований показывают различия в способах захвата корпускулярных объектов в зависимости от их размера, химической структуры и электрохимического заряда, а также типа клеток [1, 9, 10]. Имеющиеся в научной литературе данные, касающиеся механизмов эндоцитоза НА частиц МФ фрагментарны и не достаточны для прогнозирования биологических эффектов, оказываемых НА частицами, в частности, на МФ.

В этой связи целью настоящего исследования было изучение биотропности, закономерностей и механизмов захвата частиц наноразмерных алмазов марки «УДА-В-ГО» макрофагами in vitro.

Материалы и методы исследования

Эксперименты были выполнены in vitro на макрофагах из перитонеального транссудата мышейсамцов линии BALB/с 2-х месячного возраста, с массой тела 21–22 гр., полученных из питомника ФГБНУ «НИИ клинической иммунологии» (г. Новосибирск,

INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED AND FUNDAMENTAL RESEARCH № 3, 2015 Россия). Перитонеальные макрофаги (МФ) получали после выведения животных из эксперимента путем дислокации позвонков в шейном отделе под легким эфирным наркозом. Предварительно клетки из перитонеального транссудата эксплантировали в культуру и культивировали при 37°С, в течение 3-х часов на покровных стеклах для прикрепления МФ (10⁶ клеток в 1,5 мл среды 199, содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров). Через 3 часа неадгезированные клетки смывали средой для культивирования. Полученные первичные культуры МФ культивировали в течение 24 часов с целью их адаптации.

Наноалмазы (НА) марки «УДА-В-ГО» были любезно предоставлены ОАО ФНПЦ «Алтай», Россия. В исследовании использовали искусственно полученные НА в диапазоне размеров 4-6 нм. Исследование вероятных биоактивных свойств НА в отношении перитонеальных МФ проводили через 24 и 48 часов после внесения НА в первичные 24-часовые культуры МФ. В среду для культивирования вносили 1,6% стерильную суспензию НА в бидистиллированной воде до конечной концентрации 20 мкг/мл. После этого суспензию тщательно перемешивали и обрабатывали ультразвуком при помощи ультразвукового дезинтегратора МУЗА-0,1/22-М в течение 10 сек при мощности 75 Вт для разрушения вероятных агрегатов НА. Внесение в культуру НА осуществляли путем замены изначальной среды культивирования на среду, содержащую НА в соответствующей концентрации. Контролем служили МФ, в среду для культивирования которым через 24 часа культивирования вносили свежую среду культивирования взамен предыдущей, в нее предварительно вносили бидистиллированную стерильную воду в объеме, идентичном тому, что получали МФ в суспензии с НА.

Светооптическое исследование МФ в культурах проводили с помощью микроскопа «AxioImager Z1» (Zeiss, Германия) в режиме светлого поля, фазового интерференционного контраста и флуоресцентной микроскопии. Препараты клеточных культур фотографировали при помощи цифровой камеры «AxioCam HRc» (Zeiss, Германия). Для анализа накопления НА в МФ был проведен морфометрический анализ микрофотографий агрегатов исследуемых НА частиц при исследовании их в проходящем свете и флуоресцентном освещении. Анализ яркостных характеристик НА и их агрегатов на полученных цифровых фотографиях проводили при помощи программы «ВидеоТест Морфо 3.2» (г. Санкт-Петербург). Для выявления НА в МФ было использовано комбинированное освещение препаратов - одновременно в проходящем свете при установленном зеленом светофильтре и индуцированной флуоресценции МФ (дополнительно окрашенных акридиновым оранжевым), в «зеленой» области флуоресценции (при установке узкополосного светофильтра, предназначенного для исследования ФИТЦ-флуоресценции).

Методы электронно-микроскопического исследования биотропности макрофагов, подвергнутых воздействию наноразмерных алмазных частиц. Образцы клеточных культур для электронной микроскопии фиксировали 2,5% раствором глютарового альдегида в 0,1 М какодилатном буфере, дальнейшую обработку образцов проводили по методикам, описанным ранее [4]. Микрофотографии были получены на трансмиссионном электронном микроскопе «JEM 1400» (JEOL, Япо-ния) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Для анализа захвата и интернализации НА частиц МФ проводили визуальный анализ полученных изображений для разных временных точек инкубации МФ с наночастицами и сопоставляли с изображениями, полученными в контроле.

Полученные данные были статистически обработаны с помощью лицензированных пакетов прикладных программ «Statistica v.6» и «Excel v.7». Вычисляли среднюю величину (М) и стандартную ошибку среднего (SE или m). Данные представлены в виде М \pm m. Вероятность достоверности различий между сравниваемыми средними величинами исследованных показателей в экспериментальных группах культур оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считали достоверными при величине вероятности принятия нулевой гипотезы о принадлежности сравниваемых независимых выборок к одной и той же генеральной совокупности (H₀) с вероятностью р < 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования эндоцитозной активности МФ в отношении НА использовали метод фазового интерференционного контраста при обычном освещении и метод фазового контраста в поляризованном свете. При исследовании культуры МФ методом фазового контраста при обычном освещении выявляемые вакуоли выглядели как достаточно однородные оптически плотные структуры. Выявляемые вакуоли были гетерогенны по размерам и занимали значительную часть цитоплазмы МФ. При помощи метода фазово-контрастной микроскопии в поляризованном свете было показано, что исследуемые вакуоли МФ гетерогенны по оптической плотности даже в переделах отдельных вакуолей, что свидетельствовало о наличии в них частиц НА. Однако указанные методы не позволяли морфометрически оценить количество НА, накапливающихся в МФ, поскольку метод фазовоконтрастной микроскопии «высвечивает» все оптически разнородные клеточные структуры. Для анализа накопления НА в МФ было проведено исследовании культур МФ при комбинированном освещении – проходящем свете и флуоресцентном освещении (рис. 1), при котором накопившиеся в МФ частицы НА выглядели значительно темнее (5-10 единиц по международной шкале градаций серого цвета, оцениваемого в диапазоне 0–255), чем стеклянная подложка (235–250).

При таком способе анализа МФ было отчетливо видно, что эндоцитозные вакуоли содержат оптически плотный материал, соответствующей оптической яркости НА в проходящем свете – 5–10 единиц (рис. 1). Большинство эндосом при сходной оптической яркости значительно варьировало по величине, что косвенно указывало на то, что образование крупных фагосом может

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЖУРНАЛ ПРИКЛАДНЫХ И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ № 3, 2015 происходить в результате слияния более мелких эндосом, содержащих НА.



Рис. 1. Культура перитонеальных макрофагов, через 24 часа после внесения в нее частиц НА в концентрации 20 мкг/мл. Метод комбинированного освещения препаратов – в проходящем свете при установленной зеленом светофильтре и индуцированной флуоресценции клеток, окрашенных акридиновым оранжевым (эндоцитозные вакуоли с различной плотностью накопления в них НА обозначены стрелками). Увеличение 1000

Установлено, что количество НА частиц в МФ возрастает с увеличением времени инкубирования МФ с НА частицами (рис. 2). При этом выявлено, что количество НА частиц в МФ достигает некоторого максимума к 24 часу культивирования. Эти данные косвенно указывают на то, что через 24 часа культивирования в среде, содержащей НА частицы, вакуолярный аппарат МФ, по-видимому, полностью «насыщается» НА, что сопряжено со снижением их эндоцитозной активности в отношении к НА к этому времени.

Для исследования захвата и интернализации НА частиц в биосовместимой концентрации (20 мкг/мл) МФ исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе. Через 1 сутки после внесения НА в культуры МФ эндосомы, содержащие НА, отмечали преимущественно в зонах, прилегающих к плазмолемме МФ (рис. 3). Размеры эндосом (их диаметры) варьировали от 0,1 до 0,3 мкм. При этом в эндосомах НА располагались в виде агрегатов в наноразмерном диапазоне 25-50 нм. Наряду с эндосомами в МФ выявлялись вторичные лизосомы, содержащие частицы НА. В плазмалемме МФ наблюдали образование большого количества цитоплазматических выростов.

В случаях, когда ядро располагалось достаточно близко к плазмолемме, эндосомы с НА выявляли в перинуклеарных зонах МФ. Плотность содержания НА в фагоцитозных вакуолях, количество частиц НА в эндосомах и размеры эндосом - все эти показатели эндоцитозной активности МФ сильно варьировали по величине. Например, размеры эндосом варьировали в диапазоне 0,3-1,0 мкм, а количество НА в усл. ед. (площади, занимаемой наночастицами, в мкм²) в пересчете на одну эндосому варьировали от 0,04 до 0,09 мкм². Также через 24 и 48 часов инкубации МФ с НА частицами были обнаружены единичные НА в цитозоле МФ.



Рис. 2. Результаты исследования эндоцитоза частиц НА макрофагами в культуре в зависимости от времени культивирования (при концентрации НА 20 мкг/мл). Примечание. Вероятность достоверности различий (Р) между сравниваемыми средними величинами исследованных показателей: ** P < 0,01

INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED AND FUNDAMENTAL RESEARCH № 3, 2015



Рис. 3. Часть цитоплазмы макрофага через 1 сутки после внесения в культуру частиц НА в концентрации 20 мкг/мл. Формирование крупных эндосом, содержащих НА в зонах, прилегающих к плазмолемме МФ (обозначены стрелками). Увеличение 10000

Наряду с формированием типичных фагоцитозных эндосом, содержащих частицы НА, в МФ, культивируемых в среде с НА, отмечали в достаточно большом количестве эндосомы клатринового типа с размерами эндосом 100 нм (рис. 4). Некоторые клатриновые везикулы находились вблизи крупных эндосом, что может свидетельствовать о высокой вероятности их последующего слияния с ними. Таким образом, накопление НА в МФ могло осуществляться, вероятно, в результате работы трех механизмов: в результате активного пиноцитоза питательной среды, содержащей отдельные НА и их небольшие агрегаты НА (50-100 нм); эндоцитоза крупных агрегатов НА (более 100 нм); эндоцитоза с формированием клатриновых эндоцитозных везикул с НА (в размерном диапазоне 5-10 нм). Отмечена высокая активность плазмалеммы, характеризующаяся образованием большого количества цитоплазматических выростов. При этом плазмалемма имела сложную конфигурацию с формированием смыкающихся друг с другом цитоплазматических выростов, формирующих эндоцитозные вакуоли.

Через 2 сутки после внесения НА в культуры МФ эндосомы, содержащие НА, наблюдали достаточно равномерно по всей цитоплазме, от зоны, прилегающей к плазмолемме МФ до перинуклеарной зоны (рис. 5).

Размеры эндосом варьировали в диаметре от 0,5 до 0,9 мкм. В эндосомах НА располагались в виде плотных агрегатов в наноразмерном диапазоне 50–100 нм. Наряду с типичными эндосомами, содержащими НА, в МФ выявляли крупные вакуоли, содержащие частицы НА, с менее плотной их «упаковкой» и характерной компартментализаций, что свидетельствовало, о том, что такие эндоцитозные вакуоли могли образовываться в результате слияния более мелких эндосом.



Рис. 4. Часть цитоплазмы макрофага через 2 суток после внесения в культуру частиц НА в концентрации 20 мкг/мл. Формирование смыкающихся друг с другом цитоплазматических выростов плазмалеммы, формирующих крупные эндоцитозные вакуоли. Формирование клатриновых везикул, содержащих частицы НА (обозначены стрелками). Увеличение 10000



Рис. 5. Макрофаг из культуры перитонеальных макрофагов мышей через 2 суток после внесения в культуру частиц НА в концентрации 20 мкг/мл. Эндосомы, содержащие НА, располагаются равномерно по всей цитоплазме (обозначены стрелками), от зоны, прилегающей к плазмолемме макрофага до перинуклеарной зоны. Увеличение 5000

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЖУРНАЛ ПРИКЛАДНЫХ И ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ № 3, 2015

Заключение

Таким образом, по данным электронномикроскопического анализа МФ, «сокультивированных» с НА частицами в концентрации 20 мкг/мл в культуральной среде, можно сделать заключение, что исследованные НА марки «УДА-В-ГО» обладают тропностью к структурам вакуолярного аппарата МФ. Захват НА осуществлялся тремя механизмами: в результате активного пиноцитоза питательной среды, содержащей отдельные НА и их небольшие агрегаты НА (50-100 нм); эндоцитоза крупных агрегатов НА (более 100 нм); эндоцитоза с формированием клатриновых эндоцитозных везикул с НА (в размерном диапазоне 5-10 нм).

Список литературы

1. Малюгин А.В., Гхандехари Х. Внутриклеточный захват и токсичность неорганических наночастиц // Развитие научно-технического сотрудничества российских научных и научно-образовательных центров с учеными-соотечественниками, работающими за рубежом: Сборник тезисов выступлений. – М., 2011. – С. 60–63.

2. Онищенко Г.Г., Арчаков А.И., Бессонов В.В., Бокитько Б.Г., Гинцбург А.Л., Гмошинский И.В., Григорьев А.И., Измеров Н.Ф., Кирпичников М.П., Народицкий Б.С., Покровский В.И., Потапов А.И., Рахманин Ю.А., Тутельян В.А., Хотимченко С.А., Шайтан К.В., Шевелева С.А. Методические подходы к оценке безопасности наноматериалов // Гигиена и санитария. – 2007. – №6. – С. 3–10.

3. Шкурупий В.А., Архипов С.А., Нещадим Д.В., Ахраменко Е.С., Троицкий А.В. Исследование влияния частиц наноразмерных алмазов на макрофаги in vitro // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – № 10. – С. 503–506.

4. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих: пер. с англ. – М.: Издательство «Мир», 1975. – С. 336.

5. Prevedebtseva E., Hong S.-F., Huang K.-J., Chiang I.-T., Lee C.-Y., Tseng Y.-T., Cheng C.-L. Nanodiamond internalization in cells and the cell // Journal of Nanoparticle Research. -2013. - V. 15. - P. 1834-1845.

6. Schrand A.M., Hens S.A.C., Shenderova O.A. Nanodiamond particles: properties and perspectives for bioapplications // Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences. – 2009. – V. 34. – № 1–2. – P. 18–74.

7. Schrand A.M., Lin J.B., Hens S.C., Hussain S.M. Temporal and mechanistic tracking of cellular uptake dynamics with novel surface fluorophore-bound nanodiamonds // Nanoscale. – 2011. – V. 3. – P. 435–445.

8. Shenderova O.A., Gruen D.M. Ultrananocrystalline diamond: Syntheses, propertie, and applications // William Andrew, 2012. – P. 584.

9. Smith P.J., Giroud M., Wiggins H.L., Gower F., Thorley J.A., Stolpe B., Mazzolini J., Dyson R.J., Rappoport J.Z. Cellular entry of nanoparticles via serum sensitive clathrinmediated endocytosis, and plasma membrane permeabilization // International Journal of Nanomedicine. – 2012. – V. 7. – P. 2045–2055.

10. Yu T., Malugin A., Ghandehari H. Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity // ACS Nano. – 2011. – V. 5. – P. 5717–5728.