

Оценка морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом атомно-силовой микроскопии после воздействия фуллерена C_{60}

Л.А. Шарафутдинова¹, Е.Н. Горшкова², И.И. Садртдинова¹,
З.Р. Хисматуллина¹, С.А. Башкатов¹

¹ – ФГБОУ ВПО «Бакирский государственный университет», Уфа

² – Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

Контактная информация: Садртдинова Индира Илдаровна, indira-asp@yandex.ru

В работе представлены результаты исследования влияния фуллерена C_{60} на морфологические параметры нейтрофилов с целью выявления его возможной токсичности. Проведена оценка морфометрических параметров нейтрофилов крови методом атомно-силовой микроскопии. Установлено, что диаметр тела и ядра клеток после воздействия фуллерена C_{60} существенно изменяется.

Ключевые слова: нейтрофилы, биосовместимость, фуллерены, атомно-силовая микроскопия.

Введение

В настоящее время одним из приоритетных направлений научно-технического прогресса является изучение и применение наноразмерных объектов. Исследования материалов на наноразмерном уровне и их использование ведутся несколько десятилетий, однако традиционно считают началом зарождения эпохи нанотехнологий открытие углеродных материалов, построенных исключительно из атомов углерода. Главная особенность этих молекул – это их каркасная форма. Среди множества структурных разновидностей углеродных наноматериалов наибольший интерес представляют фуллерены. Впервые фуллерены были открыты в 1985 г. Х. Крото, Дж. Хит, О' Брайен и Р. Смолли [8, 11], а в 1992 г. их обнаружили в

древних пластах земной коры, шунгите, а позже и в метеоритном веществе. Открытие фуллеренов удостоено Нобелевской премии по химии за 1996 г. и стало одним из ярких научных достижений конца XX века.

Наиболее полно изученный представитель семейства фуллеренов – фуллерен C_{60} . Его иногда называют «бакминстер-фуллерен», в котором 60 атомов углерода образуют многогранник из 12 пятиугольников и 20 шестиугольников, что придает такому фуллерену полное сходство с крышкой футбольного мяча, размер такой молекулы – приблизительно 10 А°. Фуллерены считаются идеальным наноконтейнером, обладающим исключительной избирательностью и высокой биодоступностью. Практически сразу фуллерены привле-

кли внимание многих исследователей, в том числе благодаря возможности их использования в биологии и медицине.

Однако в последнее время в литературе широко обсуждается вопрос о токсичности фуллеренов. Начиная с самых ранних работ [8, 11], в которых были получены данные о низкой острой токсичности фуллеренов, остался открытым вопрос о выраженности их токсичности при длительном применении. Так, были получены данные о его неблагоприятном влиянии на эмбриогенез у мышей [10], а также о его мутагенном действии на дрожжи [9] и дрозофилу [12]. Еще более остро этот вопрос встал в связи с потенциальным широкомасштабным производством фуллеренов и их широким использованием, а также высокой вероятностью загрязнения ими окружающей среды [7]. В связи с этим, начиная с 2005 г., изучению возможной токсичности фуллеренов уделяется все большее внимание.

На значимость проблемы токсичности наноматериалов указывает то, что в России 31 октября 2007 г. была утверждена «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов», разработанная Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека совместно с ведущими научными центрами и НИИ РАМН, Минобрнауки РФ и Роспотребнадзора. Исследования влияния наноматериалов на организм человека, деградации наночастиц при взаимодействии с биологическим материалом, их влиянии на метаболические процессы в живых организмах и разработка методов, позволяющих получать

эту информацию, являются в настоящее время весьма важными и актуальными задачами.

Изучение влияния наночастиц на клетки крови как важного гомеостатического фактора и показателя функционального состояния организма в целом представляется нам весьма актуальной задачей. В связи с этим, изучено влияние фуллерена C_{60} на морфометрические показатели нейтрофильных гранулоцитов (НГ) с использованием сканирующей зондовой микроскопии. Как объект исследования биосовместимости наночастиц фуллерена нейтрофилы нами взяты ввиду того, что любой вариант введения наноматериалов при использовании *in vivo* предполагает контакт с клетками неспецифической и специфической защиты. НГ периферической крови человека – наиболее чувствительные и мобильные элементы системы неспецифической резистентности организма. Это клетки, характеризующиеся высокой морфологической пластичностью, которые, выполняя свои физиологические функции, подвергаются значительным внешним перестройкам. НГ являются клетками с богатым деструктивным потенциалом, запускают процесс биодеструкции вновь поглощенных частиц, с одной стороны, и, с другой стороны, частицы сами могут оказывать негативное воздействие на различные звенья цитотоксического комплекса нейтрофилов [2].

В настоящее время изменение морфологических параметров клеток крови человека часто соотносят с физиологическими свойствами, что наряду с функциональной характеристикой дает полноценную информацию об их участии в поддержании гомеостаза [1, 2, 5].

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели была проведена пробоподготовка нейтрофильных гранулоцитов. Выделение НГ проводили по методу И.С. Подосинникова и соавт. (1981) из венозной крови условно здоровых доноров студентов-добровольцев (n=10). Выделяли нейтрофилы по стандартной методике в градиенте плотности фиколл-урографина.

Поскольку фуллерены нерастворимы в воде, готовили суспензию фуллерена C₆₀, для чего к нанопорошку добавляли физиологический раствор. Конечная концентрация фуллерена C₆₀ составила 0,75 мг/мл. Полученную суспензию тщательно перемешивали с использованием Vortex-3 и подвергали диспергированию в ультразвуковой ванне. Для определения размеров наночастиц, находящихся в исследуемой суспензии фуллерена C₆₀, использовали лазерный анализатор размеров частиц SALD-7101 (Shimadzu): спектральное разрешение 1 нм, диапазон от 10 нм до 300 мкм, метод – лазерная дифракция (УФ-лазер, длина волны излучения 375 нм). Показано, что в полученной суспензии присутствовали наночастицы фуллерена C₆₀ от 10 до 40 нм.

На базе лаборатории Научно-образовательного центра «Физика твердотельных наноструктур» Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского была создана сертифицированная методика измерений фиксированных нейтрофилов, в основе которой лежит их фиксация глутаровым альдегидом с последующими исследованием на атомно-силовом микроскопе (АСМ) [3]. Методика включает контактный режим измерения как наиболее точно передающий топографические и размерные характеристики фиксированного биоло-

гического объекта. На АСМ-изображении четко визуализируются ядро и гранулы, причем существует возможность определения латеральных размеров нейтрофилов и их высоты. Нейтрофильные гранулоциты (2·10⁶ клеток/мл) инкубировали с фуллереном C₆₀ (0,75 мг/мл) в течение 30 мин при 37°C. Далее осуществляли фиксацию нейтрофилов 1,5% глутеральдегидом на предметном стекле.

В серии экспериментов изучали нейтрофилы, полученные из крови здоровых доноров, и сравнивали морфометрические показатели до и после воздействия фуллерена C₆₀. Сканирование образцов для измерения геометрических параметров нейтрофилов производили с помощью АСМ. Исследования проводились на установке SOLVER BIOTM (NT-MDT, г. Зеленоград).

Для исследования морфологических изменений НГ в системе с фуллеренами C₆₀ проводили сканирование топографии НГ в полуконтактном режиме с использованием зондов DNP (Veeco, USA) [3]. Для визуализации сканируемых объектов применялась программа Nova NT-MDT SPM Software (NT-MDT, г. Зеленоград). Дальнейшая обработка изображений проводилась с использованием программного обеспечения SPMLab Analysis Only (Topometrix, США). В программном пакете прикладных программ Statistica (v.6.0) проведен статистический анализ полученных результатов измерений.

Результаты и их обсуждение

На рисунке представлены результаты сканирования нейтрофилов. В контрольных образцах (рис. А) нейтрофил имеет ядро округлой формы, ядерная

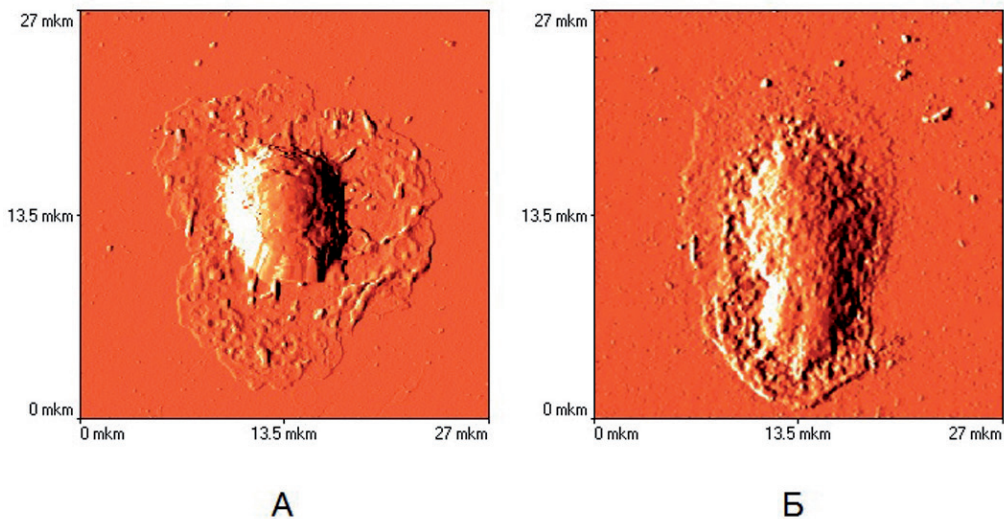


Рис. Нейтрофилы до (А) и после (Б) инкубирования с фуллереном C_{60} .

мембрана практически ровная, с незначительными выбуханиями. Цитоплазма занимает большой объем и имеет трехлопастную форму.

В таблице представлены замеры высоты нейтрофилов и поперечных размеров (диаметр) клеток.

Таблица
**Морфометрические параметры
нейтрофильных гранулоцитов,
полученные методом сканирующей
зондовой микроскопии, до и после
воздействия фуллерена C_{60}**

Параметры	Контроль	Опыт
Диаметр тела, мкм	$18,2 \pm 0,72$	$15,16 \pm 0,47^*$
Высота ядра, мкм	$4,34 \pm 0,61$	$5,98 \pm 0,71$
Диаметр ядра, мкм	$4,85 \pm 0,69$	$5,85 \pm 0,85^*$

Примечание: * – различия достоверны при $p < 0,01$.

Как следует из данных табл. и заметно на рис. Б, после воздействия фуллерена C_{60} морфология нейтрофила изменяется: ядро приобретает овально-вытянутую форму, что отражается на его размере. Так, если до воздействия диаметр ядра составлял $4,85 \pm 0,69$ мкм, то после инкубации с фуллереном C_{60} этот показатель достоверно увеличивается и составляет $5,85 \pm 0,85$ мкм. Ядерная мембрана приобретает пористый, разрыхленный вид. Объем цитоплазмы уменьшается, в некоторых областях имеет опустошенный вид, что может свидетельствовать о гибели органелл. Следует отметить, что при сравнении на АСМ-изображении контрольного образца определяется нежная зернистость, тогда как в опытном образце в цитоплазме видны грубые гранулы, что можно определить как патологическую зернистость. Также отмечается истончение мембраны на периферии клетки.

На сегодняшний день общепринято, что изменение формы клеточного ядра

является существенным диагностическим признаком: деформация ядер цитоплазматическими включениями при дистрофических процессах, полиморфизм ядер при воспалении (гранулематоз) и опухолевом росте (клеточный атипизм) свидетельствует о дифункциональных изменениях клетках крови в ответ на токсическое воздействие.

Выводы

Таким образом, сравнение морфометрических показателей нейтрофильных гранулоцитов показало, что воздействие фуллерена C₆₀ приводит к значительному снижению диаметра тела клетки и увеличению диаметра ядра ($p < 0.01$). Наблюдаемый нами сдвиг морфометрических параметров нейтрофилов является маркером изменения их функциональной активности и может свидетельствовать о потенциальной цитотоксичности фуллерена C₆₀.

Список литературы

1. Гуцина Ю.Ю., Плескова С.Н., Звонкова М.Б. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2005. № 1. С. 48-53.
2. Маянский А.Н., Пикуза О.И. Клинические аспекты фагоцитоза. Казань: Магариф. 1993. 192 с.
3. Плескова С.Н. Атомносиловая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. Уч. пособие. Интеллект-групп. 2011. 184 с.
4. Плескова С.Н., Горшкова Е.Н., Михеева Э.Р., Шушунов А.Н. Исследование биосовместимости нанопорошка с флюоресцирующим центром Er/Yb в системе с нейтрофильными гранулоцитами // Цитология. 2011. Т. 53. № 5. С. 444-449.
5. Санпрыкин В.П. Морфологические варианты нейтрофильных гранулоцитов крови практически здоровых людей // Морфология. 2001. Т. 120. № 6. С. 37-41.
6. Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C. C60: Buckminsterfullerene // Nature. 1985. Т. 318. P. 62-63.
7. Kulkarni P.P., Jafvert C.T. Solubility of C60 in solvent mixtures // Environ. Sci. Technol. 2008. Т. 42. P. 845-851.
8. Nelson M.A., Domann F.E., Bowden G.T., Hooser S.B., Fernando Q., Carter D.E. Effects of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extracts on the mouse skin // Toxicol. Ind. Health. 1993. Т. 9. P. 623-630.
9. Sera N., Tokiwa H., Miyata N. Mutagenicity of the fullerene C60-generated singlet oxygen dependent formation of lipid peroxides // Carcinogenesis. 1996. Т. 17. P. 2163-2169.
10. Tsuchiya T., Oguri I., Yamakoshi Y.N., Miyata N. Novel harmful effects of fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo // FEBS Lett. 1996. Т. 393. P. 139-145.
11. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E., Kikuchi K., Kananishi S. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: 14C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity // Chem. Biol. 1995. Т. 2. P. 385-389.
12. Zakharenko L.P., Zakharov I.K., Vasiunina E.A., Karamysheva T.V., Danilenko A.M., Nikiforov A.A. Determination of the genotoxicity of fullerene C60 and fullerol using the method of somatic mosaics on cells of Drosophilla melanogaster wing and SOS-chromotest // Genetika. 1997. Т. 33. P. 405-409.

Neutrophils morphological parameters estimation by nuclear and power microscopy after fullerene C₆₀ influence

L.A. Sharafutdinova, E.N. Gorshkova, I.I. Sadrtidinova, Z.R. Khismatullina

Fullerene C₆₀ possible toxicity upon morphological parameters of human neutrophils influence was investigated. Blood neutrophils morphological parameters by nuclear and power microscopy were estimated. It was disappeared that cell soma and nuclei diameters after fullerene C₆₀ exposure were changed significantly.

Key words: neutrophils, biocompatibility, fullerenes, atomic force microscopy.