

© Коллектив авторов, 2009
УДК 611.018.5:578.6

*С.Н. Плескова^{1,2}, И.В. Балалаева^{1,3}, Ю.Ю. Гущина², Е.А. Сергеева¹, Т.А. Здобнова^{1,4},
С.М. Деев⁴ и И.В. Турчин¹*

РАЗЛИЧИЯ В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ПОЛУПРОВОДНИКОВЫМИ КВАНТОВЫМИ ТОЧКАМИ

¹ Лаборатория биофотоники (зав. — канд. физ.-мат. наук И.В. Турчин) Института прикладной физики РАН, г. Нижний Новгород, e-mail: plsn@mail.ru, pleskova@mail.ru; ² Научно-образовательный центр физики твердотельных наноструктур (дир. — проф. Е.В. Чупрунов) Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, e-mail: irin-b@mail.ru, gushina@phys.unn.ru; ³ кафедра биофизики (зав. — доц. В.А. Воденев) Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского; ⁴ лаборатория молекулярной иммунологии (зав. — чл.-кор. РАН С.М. Деев) Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

Используя методы сканирующей лазерной и зондовой микроскопии, исследовано поглощение нейтрофильными гранулоцитами крови человека квантовых точек (КТ — частиц CdSe/ZnS-меркаптоуксусной кислоты диаметром 5 нм). Результаты демонстрируют разделение нейтрофильных гранулоцитов на 3 субпопуляции: 1) клетки, не поглощавшие КТ ($10,0 \pm 2,0\%$); 2) клетки, аккумулировавшие в своем объеме КТ ($28,0 \pm 1,9\%$); 3) клетки, окруженные ореолом КТ ($59,0 \pm 2,2\%$). Дисперсия характеристик может свидетельствовать о различной проницаемости для КТ внешних мембран нейтрофильных гранулоцитов.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, полупроводниковые квантовые точки, сканирующая лазерная микроскопия, сканирующая зондовая микроскопия.

Нейтрофильные гранулоциты (НГ) представляют собой неоднородную клеточную популяцию, играющую важную роль в системе неспецифической резистентности [3]. Накоплено большое количество данных о различиях в строении и функциональных характеристиках НГ, что позволяет на основании разных базовых признаков разделить их на субпопуляции [1, 6]. Морфологические и биохимические особенности НГ определяют различия в их поведении [2].

Квантовые точки (КТ) представляют собой полупроводниковые наночастицы, размером от 2 до 6 нм, поведение которых описывается законами квантовой механики [7]. В последнее время предпринимаются попытки использовать КТ для неинвазивной визуализации внутренних структур организма (в том числе для диагностики злокачественных новообразований) и исследований внутриклеточного транспорта [8].

Цель настоящей работы — оценка способности НГ к поглощению КТ, определение динамики и особенностей процесса их поглощения у разных субпопуляций НГ.

Материал и методы. НГ выделяли из венозной крови здоровых доноров ($n=12$) на двойном градиенте фикола-верографина по методике И.В. Подосинникова и соавт. [5]. НГ отмывали забуференным изотоническим раствором натрия хлорида и взвешивали в растворе Хенкса в начальной концентрации 1 млн/мл. Выделенные НГ вносили в термостатируемую жидкостную ячейку (37°C) конфокального

флюоресцентного микроскопа Carl Zeiss Axiovert 200M LSM 510 META (Германия). В течение 90 мин вели покадровую съемку контроля (интактные НГ) с 8-секундным интервалом (об. 100). В подопытных пробах проводили наблюдение за НГ в течение 100 мин после внесения в систему КТ, после чего подсчитывали в разных полях 100 НГ, которые разделяли на 3 субпопуляции: не поглощавшие КТ, аккумулировавшие в своем объеме КТ и окруженные ореолом КТ. В каждой серии экспериментов определяли относительное содержание каждой субпопуляции.

КТ в представленной работе использовали в качестве объекта поглощения: благодаря такому их уникальному свойству, как устойчивость к фотовыцветанию, удается отслеживать динамику процесса.

КТ CdSe/ZnS-МУК (меркапто-уксусная кислота) взвешивали в фосфатно-солевом буфере в начальной концентрации 0,06 мг/мл и вносили в термостатируемую жидкостную ячейку к НГ в объемном соотношении 1:1.

Поглощение НГ КТ исследовали в течение 100 мин, с интервалом между кадрами 16 с, после чего клетки фиксировали метанолом и исследовали методом сканирующей зондовой микроскопии [4].

Результаты исследования. В течение 90 мин проводили наблюдение за нативными клетками в термостатируемой жидкостной ячейке. НГ демонстрировали миграционную активность разной степени интенсивности. Отчетливо выделялось движение гранул в клетках.

Через 10–15 мин после внесения в ячейку КТ CdSe/ZnS-МУК (0, 03 мг/мл) наблюдалось постепенное их концентрирование внутри некоторых из НГ (рис. 1). Однако образования псев-

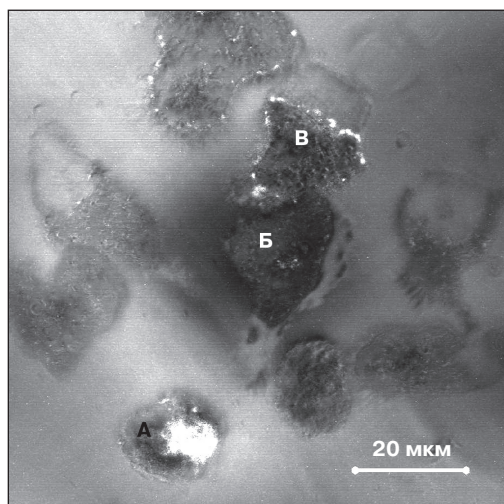


Рис. 1. Три субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов, различаемые по способности поглощать квантовые точки (КТ — белые).

А — клетки, аккумулировавшие в своем объеме КТ; Б — клетки, не поглощавшие КТ; В — клетки, окруженные ореолом КТ. Изображение получено с помощью конфокального микроскопа через 60 мин после внесения КТ.

доподий у данных НГ за все время наблюдения не происходило.

Формирование изображения в режиме 3D показало, что в данном случае КТ заполняют отдельные компартменты клетки, концентрируясь в них (рис. 2).

Через 45 мин после добавления CdSe/ZnS-МУК у небольшого числа НГ появлялась высокая степень двигательной активности. Строение клеток существенно изменялось, в распластанной части клетки визуализировались атипично крупные гранулы (см. рис. 1). Клетки формировали псевдоподии, однако не поглощали КТ.

Через 100 мин от начала инкубации с КТ четко выделялись 3 типа клеток: 1) клетки, акку-

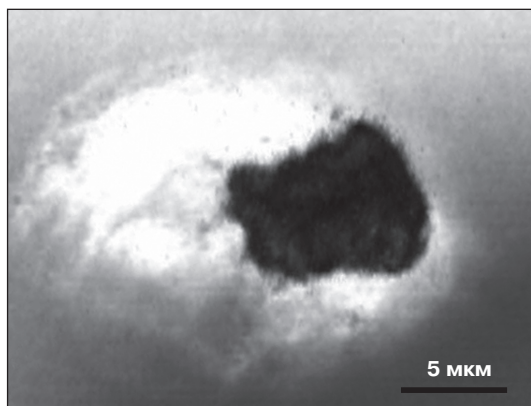


Рис. 2. Аккумуляция квантовых точек в объеме нейтрофильного гранулоцита первого типа.

Светлый участок — границы клетки; темный — аккумуляция КТ. 3D-изображение получено с помощью конфокального микроскопа.

мулировавшие в своем объеме КТ, — $28,0 \pm 1,9\%$; 2) клетки, не поглощавшие КТ, — $10,0 \pm 2,0\%$ и 3) клетки, окруженные ореолом КТ, — $59,0 \pm 2,2\%$ (см. рис. 1). Возникновение ореола происходило в разное время наблюдения (от 40 до 90 мин).

Полученные результаты демонстрируют изменение строения клеток, в частности, клетки второго типа имеют отчетливо видимое сегментированное ядро, тогда как клетки третьего типа характеризуются отсутствием ядра и хорошо контрастируются ореолом из КТ (рис. 3).

Обсуждение полученных данных. Анализ полученных данных свидетельствует об особенностях процесса поглощения НГ КТ. Во-первых, при используемой концентрации 5 нм CdSe/ZnS-МУК ($0,03$ мг/мл) НГ не формируют псевдоподии для их поглощения. По всей вероятности, малые размеры КТ не дают возможности клеткам проводить «классический» фагоцитоз, и КТ поступают в клетку трансмембранно, хотя требуются дополнительные доказательства такой возможности. Во-вторых, результатом поглощения КТ явилось разделение клеток на 3 группы: клетки, аккумулирующие в своем объеме КТ; клетки, не поглощающие КТ, и клетки, окруженные ореолом из КТ.

Имеется сходство морфологической градации клеток с результатами, полученными В.П. Сапрыкиным и С.Л. Кузнецовым [6]. Эти авторы, используя метод электронной микроскопии, разделили все НГ крови на 3 субпопуляции: 1) клетки с хорошо выраженной зернистостью цитоплазмы — $58,0 \pm 1,0\%$; 2) клетки с умеренно выраженной зернистостью цитоплазмы — $30,0 \pm 1,2\%$ и 3) НГ с отсутствием зернистости цитоплазмы — $12,0 \pm 0,9\%$.

Таким образом, относительное содержание морфологических субпопуляций клеток практически идентично тому, что получено в ходе наших экспериментов. Возможно, такое совпадение случайно. Однако НГ, отнесенные В.П. Сапрыкиным и С.Л. Кузнецовым к активированным ($12,0 \pm 0,9\%$), и в нашем эксперименте обнаруживают наиболее высокую степень двигательной активности: подвижность; быстрое формирование атипично крупных гранул, активно перемещавшихся внутри цитоплазмы. По нашим данным, доля таких НГ составила $10,0\%$. Именно эти клетки, несмотря на высокую двигательную активность, не способны к поглощению КТ, что определяется по отсутствию в них КТ от начала до конца наблюдения. У 28% клеток не проявлялось признаков хемотаксической активности, но они быстро аккумулировали КТ. При этом во всех случаях наблюдалось накопление КТ только в отдельных компартментах клеток (только там, где отсутствовало ядро).

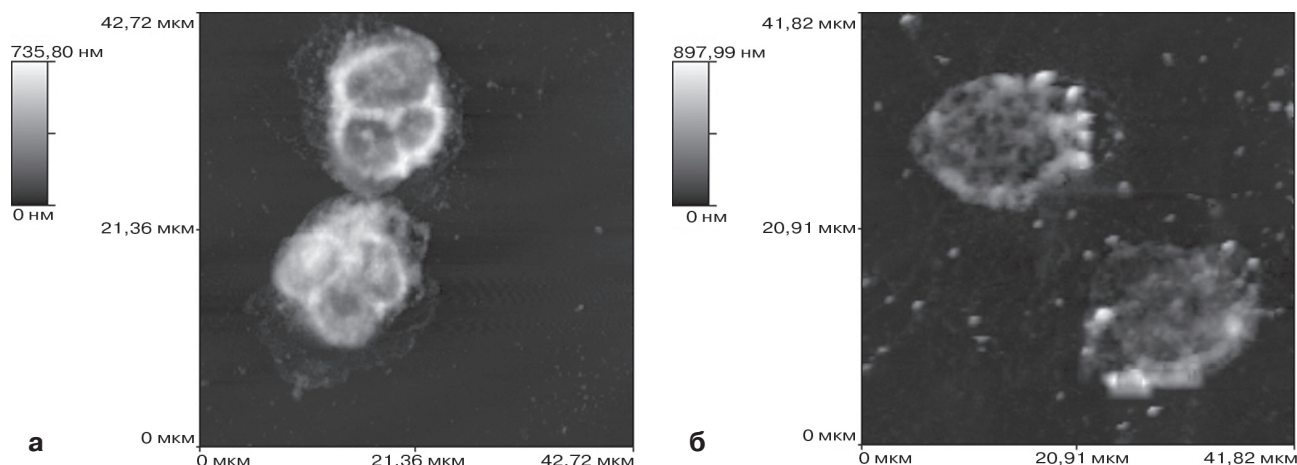


Рис. 3. Субпопуляции нейтрофильных гранулоцитов второго типа, не поглощавших КТ (а), и третьего типа, окруженных ореолом квантовых точек (б).

а — отчетливо видно сегментированное ядро и отсутствие включений; б — крупные агрегаты КТ отчетливо видны по периферии клеток, тогда как ядро не визуализируется. Клетки фиксированы метанолом и сканированы в воздушной среде с помощью сканирующего зондового микроскопа (слева представлена шкала высот).

Наиболее многочисленную субпопуляцию НГ составили клетки, окруженные ореолом из КТ. Этот ореол четко визуализировался методом сканирующей лазерной микроскопии и прописывался зондом в сканирующей зондовой микроскопии.

Таким образом, на основании изложенного, можно сделать заключение о функциональной неоднородности НГ. Выделены 3 субпопуляции клеток, различающиеся по способности к интернализации и накоплению КТ.

Авторы выражают признательность Институту биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова за предоставление для исследования квантовых точек.

Работа выполнена при поддержке проекта Федерального агентства по науке и инновациям (№ 02.522.11.2002), грантов РФФИ (№ 07-04-01586, 08-02-01293), CRDF № RUX0-001-NN-06, а также программ фундаментальных исследований президиума РАН «Фемтосекундная оптика и новые оптические материалы» и «Фундаментальные науки — медицине».

ЛИТЕРАТУРА

- Герасимов И.Г. и Игнатов Д.Ю. Особенности активации нейтрофилов in vitro. Цитология, 2004, т. 46, № 2, с. 155–158.
- Герасимов И.Г. и Игнатов Д.Ю. Функциональная неравнозначность нейтрофилов крови человека: генерация активных форм кислорода. Цитология, 2001, т. 43, № 1, с. 432–436.
- Маянский А.Н. и Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск, Наука, 1989.
- Плескова С.Н., Звонкова М.Б. и Гушина Ю.Ю. Исследование морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом сканирующей зондовой микроскопии. Морфология, 2005, т. 127, вып. 1, с. 60–62.
- Подосинников И.В., Нилова Л.Г. и Бабинов И.В. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов. Лаб. дело, 1981, № 8, с. 68–70.

- Сапрыкин В.П. и Кузнецов С.Л. Морфологические варианты нейтрофильных гранулоцитов крови практически здоровых людей. Морфология, 2001, т. 120, вып. 6, с. 37–41.
- Hoshino A., Fujioka K., Oku T. et al. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells. Microbiol. Immunol., 2004, v. 48, № 12, p. 985–994.
- Hoshino A., Manabe N., Fujioka K. et al. Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine: surface modification regulates biological function, including cytotoxicity. J. Artif. Organs, 2007, v. 10, p. 149–157.

Поступила в редакцию 17.09.08
Получена после доработки 03.12.08

DIFFERENCES IN THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF HUMAN NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN THEIR INTERACTIONS WITH SEMICONDUCTOR QUANTUM DOTS

S.N. Pleskova, I.V. Balalayeva, Yu.Yu. Gushchina, Ye.A. Sergeyeva, T.A. Zdobnova, S.M. Deyev and I.V. Turchin

The uptake of quantum dots (QD – 5 nm particles of CdSe/ZnS-mercaptopropionic acid) by human neutrophilic granulocytes was studied using the methods of scanning laser and scanning probe microscopy. The results show that the neutrophilic granulocytes may be subdivided into three subpopulations: 1) the cells with no uptake of QD ($10.0 \pm 2.0\%$); 2) cells that accumulate QD in their volume ($28.0 \pm 1.9\%$), and 3) cells, surrounded by a halo of QD ($59.0 \pm 2.2\%$). The dispersion of these characteristics may suggest the differences in neutrophilic granulocyte plasma membrane permeability.

Key words: neutrophilic granulocytes, semiconductor quantum dots, scanning laser microscopy, scanning probe microscopy.

Laboratory of Biophotonics, RAS Institute of Applied Physics, Nizhny Novgorod, Scientific-Educational Center of Solid State Nanostructure Physics, N.I. Lobachevskiy Nizhny Novgorod State University, Laboratory of Molecular Immunology, M.M. Shemyakin and I.Yu. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow.