

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ АКТИВАЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ

Е. Н. Голубева¹, Т. А. Кулагова^{1,2*}, Ю. С. Леоник², М. В. Шуба¹, Г. Н. Семенкова²

УДК 535.375.5;577.2:616-006;577.3:576.5;577.352

¹ Институт ядерных проблем Белорусского государственного университета, 220006, Минск, Беларусь; e-mail: tatyana_kulagova@tut.by

² Белорусский государственный университет, 220030, Минск, Беларусь

(Поступила 25 сентября 2020)

Определены механизмы активации нейтрофилов при взаимодействии с многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ), функционализированными группами –COOH (МУНТ-COOH), и в комплексах с ДНК (МУНТ-COOH/ДНК) с применением метода комбинационного рассеяния света (КР). Выявлено, что короткие (100–300 нм) МУНТ-COOH и МУНТ-COOH/ДНК при взаимодействии с нейтрофилами вызывают реорганизацию цитоскелета: активируют полимеризацию в клетках G-актина до F-актина. Методом КР-спектроскопии установлено, что исследуемые УНТ не фагоцитируются нейтрофилами. МУНТ-COOH усиливают генерацию активных форм кислорода и хлора нейтрофилами: повышение активности НАДФН-оксидазы зарегистрировано в суспензии клеток. Взаимодействие нейтрофилов с МУНТ-COOH/ДНК приводит к угнетению кислородоактивирующей способности фагоцитов и образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек с включением углеродных наноструктур. Свободнорадикальные продукты, генерируемые нейтрофилами, нарушают кристаллическую структуру МУНТ.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния света, многостенные углеродные нанотрубки, нейтрофилы, фагоцитоз, активные формы кислорода, хемилюминесценция.

Using the Raman spectroscopy method we determined the mechanisms of neutrophil activation under the interaction with multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) functionalized by the COOH groups (MWCNT-COOH) and in complexes with DNA (MWCNT-COOH/DNA). It was revealed that short (100–300 nm) MWCNT-COOH and MWCNT-COOH/DNA, when interacting with neutrophils, cause cytoskeleton reorganization, namely, they activate G-actin polymerization to F-actin in cells. Raman spectroscopy revealed that the investigated CNTs are not phagocytosed by neutrophils. MWCNT-COOH enhance the generation of reactive oxygen and chlorine species by neutrophils, which is confirmed by increasing the NADPH oxidase activity in the cell suspension. The interaction of neutrophils with MWCNT-COOH/DNA leads to the inhibition of the phagocyte oxygen-activating ability and to the formation of neutrophilic extracellular traps with the inclusion of carbon nanostructures. The free radical products generated by neutrophils disrupt the crystal structure of MWCNTs.

Keywords: Raman spectroscopy, multi-walled carbon nanotubes, neutrophils, phagocytosis, reactive oxygen species, chemiluminescence.

Введение. Углеродные нанотрубки (УНТ) являются перспективными материалами для терапии опухолей — методов терапии, сочетающих диагностику и терапевтическое воздействие [1]. УНТ активно применяются как проводящий биосовместимый материал при разработке клеточных

APPLICATION OF RAMAN SPECTROSCOPY FOR STUDYING THE MECHANISMS OF NEUTROPHIL ACTIVATION BY CARBON NANOTUBES

L. N. Golubewa¹, T. A. Kulahava^{1,2*}, Y. S. Leonik², M. V. Shuba¹, G. N. Semenkova² (¹ Institute for Nuclear Problems of Belarusian State University, Minsk, 220006, Belarus; e-mail: tatyana_kulagova@tut.by;

² Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus)

сенсоров и скаффолдов [2, 3]. Известно, что УНТ могут накапливаться в клетках [4] и их локализацию можно визуализировать методом комбинационного рассеяния света (КР) [5, 6]. При этом УНТ могут использоваться в качестве универсальных носителей препаратов в область локализации опухоли за счет ковалентной функционализации специфическими антителами [7] и формирования комплексов с переносимыми препаратами [8], а также выступать в качестве противоопухолевого агента самостоятельно. Это обусловлено способностью УНТ эффективно поглощать излучение в ИК-диапазоне и преобразовывать поглощенную энергию в энергию колебаний, что вызывает значительное увеличение температуры и давления в области локализации УНТ и приводит к разрушению опухоли [9, 10].

При разрушении опухолевых клеток формируется очаг воспаления, куда направляются различные иммунные клетки. Нейтрофильные гранулоциты мигрируют к месту повреждения ткани, внедрения в организм чужеродных объектов (бактериальных и грибковых патогенов, клеток простейших) и развития воспаления, а также участвуют в элиминации собственных поврежденных, трансформированных клеток и продуктов их распада [11]. Основная функция нейтрофилов — фагоцитоз, в результате которого чужеродные объекты попадают внутрь клетки и разрушаются в фаголизосоме с помощью активных форм кислорода (АФК) и хлора (АФХ) и цитотоксических, протеолитических ферментов гранул [11, 12]. При этом образование свободнорадикальных продуктов, дегрануляция, секреция ферментов и хемоаттрактантов нейтрофилами возможны в очаге воспаления и без запуска процесса фагоцитоза, например при адгезии [11—13]. При невозможности запустить фагоцитоз нейтрофилы, разрушаясь, образуют во внеклеточном пространстве “нейтрофильные внеклеточные ловушки” (НВЛ): сетеподобные структуры, в состав которых входят ДНК, гистоны, различные белки и ферменты гранул, такие как эластаза и миелопероксидаза (МПО) [14, 15].

Развитие и формирование опухоли происходит в присутствии нейтрофилов [16]. Эти иммунокомпетентные клетки первыми мигрируют к опухолям на ранних стадиях их формирования и пытаются предотвратить накопление трансформированных клеток [17, 18]. По мере роста опухоли увеличивается количество нейтрофилов в крови и в самой опухоли [19]. Показано, что инфильтрация сформированной опухоли нейтрофилами стимулирует ангиогенез и метастазирование [16, 20, 21]. Накопление УНТ в опухолевых клетках с целью разрушения и/или доставки лекарственных препаратов, а также выход УНТ из разрушенных клеток приведет к взаимодействию нейтрофилов и макрофагов с этими нанообъектами.

Структура, тип функционализации и размеры УНТ в значительной мере определяют характер их взаимодействия с нейтрофилами. Показано [22], что одностенные УНТ (ОУНТ) при введении в кровь крысам с артритом накапливаются в нейтрофилах и переносятся клетками в сформированный в суставе очаг воспаления. Выявлено, что при взаимодействии с карбоксилированными ОУНТ нейтрофилы образуют НВЛ, в которых происходит разрушение нанообъектов [23]. МПО, входящая в структуру НВЛ, катализирует гипохлорит-индуцированную деградацию этого углеродного наноматериала [24]. Согласно [25—27], фагоцитирование ОУНТ и многостенных УНТ (МУНТ) фагоцитами усиливается в присутствии поверхностно-активных веществ, полиэтиленгликоля. Выявлено, что цитотоксическое и иммуностимулирующее действие МУНТ усиливается с уменьшением их диаметра [28]. При ингаляционном введении МУНТ лабораторным животным зарегистрирован фиброз тканей вокруг наночастиц, усиление синтеза цитокинов и инфильтрация легких лимфоцитами и нейтрофилами [28, 29].

Понимание взаимодействия между нейтрофилами и УНТ важно для разработки безопасных и эффективных наноматериалов для биомедицинских приложений. В связи с этим актуальны разработка методических подходов для визуализации УНТ в биосистемах и выявление физико-химических и биофизических основ взаимодействия нанообъектов с нейтрофилами.

Цель данной работы — определение механизмов активации нейтрофилов при взаимодействии с МУНТ, функционализированными группами $-\text{COOH}$ (МУНТ- COOH), и в комплексах с ДНК (МУНТ- COOH /ДНК) с применением метода комбинационного рассеяния света (КР).

Эксперимент. Использованы МУНТ производства Bayer Baytubes (Германия), полученные методом химического парофазного осаждения, степень очистки $>90\%$. Длина МУНТ 100—600 нм, внутренний диаметр 8 нм, внешний 20 нм. МУНТ с линейными размерами 100—300 нм получены методом [30]. Функционализацию УНТ карбоксильными группами ($-\text{COOH}$) проводили согласно [31]. Появление групп $-\text{COOH}$ на МУНТ контролировали методом ИК-спектроскопии (Vertex-70, Bruker, Германия). Для этого изготавливали образцы в виде частично прозрачной в ИК-диапазоне ($400\text{—}10000\text{ см}^{-1}$) пленки из МУНТ на кремниевой подложке.

Нековалентную функционализацию МУНТ-СООН проводили в физиологическом растворе, содержащем ДНК в концентрации 300 мкг/мл, в ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т в течение 30 мин, после чего суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 5000g, чтобы осадить крупные агломераты МУНТ-СООН. Для работы использовали супернатант, представляющий собой стабильную суспензию комплексов МУНТ-СООН/ДНК или МУНТ-СООН. Регистрацию появления дефектов в структуре МУНТ в результате ломки или функционализации осуществляли методом КР-спектроскопии на конфокальном 3D-сканирующем (флуоресцентном) КР-микроскопе NanoFinder HighEnd (Tokyo Instruments, Япония – LotisIII, Беларусь), $\lambda = 532$ нм, 3.2 мВт, время экспозиции 30.0 с. Определение концентрации МУНТ в суспензиях проводили спектрофотометрическим методом [32].

Выделение нейтрофилов из периферической крови доноров проводили по методике [33]. Консервированную с гепарином кровь перемешивали из расчета 5:1 с 7 %-ным раствором декстрана Т70 в 0.15 моль/л NaCl и инкубировали в течение 60 мин. Лейкоплазму (7 мл) наслаивали на 3 мл гистопака и центрифугировали в течение 30 мин при 400g для разделения лейкоцитов по плотности. В осажденной фракции проводили гипотонический лизис эритроцитов, затем нейтрофилы дважды отмывали в 0.15 моль/л NaCl, центрифугируя в течение 10 мин при 400g. Полученную фракцию клеток суспендировали в сбалансированном солевом растворе Эрла (ССРЭ) при pH 7.2. В полученной фракции клеток содержание нейтрофилов ≥ 96 %.

Генерацию АФК нейтрофилами исследовали хемилюминесцентным (ХЛ) методом с применением компьютеризированного измерительного комплекса, включающего в себя биохемилуминометр (“БХЛ-1”, Беларусь) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom (Беларусь). Измерения проводили в ССРЭ при 37 °С. Супероксидные анион-радикалы определяли методом люцигениноповеденной ХЛ (люц-ХЛ). Суммарное количество АФК и АФХ оценивали с помощью люминолоповеденной ХЛ (люм-ХЛ) [34]. Концентрация люцигенина $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, люминола $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Количество нейтрофилов в 1 мл составляло $1 \cdot 10^6$ клеток. Генерацию нейтрофилами АФК наблюдали при активации клеток в процессе адгезии на стекло и при стимуляции хемотаксическим пептидом fMLP. Интегральную интенсивность (ИИ) ХЛ оценивали как площадь под кинетической кривой при стимуляции адгезией в течение 12 мин, при действии fMLP в течение 7 мин. Подготовленную суспензию УНТ добавляли к суспензии клеток перед измерением. Для предотвращения адгезии нейтрофилы в суспензии наслаивали на раствор 20 % фикола.

Секреторную дегрануляцию определяли по высвобождению МПО из нейтрофилов после их стимуляции адгезией в течение 30 мин. Для этого 1 мл суспензии клеток ($1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл) помещали в стеклянную кювету и инкубировали при 37 °С. Затем в надосадочной жидкости активность МПО регистрировали методом ХЛ в присутствии люминола ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и H_2O_2 ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) [35]. ИИ ХЛ оценивали как площадь под кинетической кривой за 5 мин.

Для изучения реорганизации цитоскелета клетки на стеклянных подложках и в суспензии инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С в присутствии МУНТ-СООН и МУНТ-СООН/ДНК. Затем фиксировали на стеклянных подложках и в микропробирках 4 %-ным раствором параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре. Клетки в суспензии дважды отмывали центрифугированием (1500g, 5 мин), после чего наносили монослой клеток на покровное стекло. Покровные стекла с монослоем клеток трижды промывали ФБР, проводили пермеабиллизацию клеточных мембран 0.1 %-ным раствором Triton X-100, трижды промывали ФБР, добавляли 50 мкл флуоресцентного красителя 532 Phalloidin, инкубировали 60 мин при комнатной температуре и 100 % влажности. Затем покровное стекло дважды промывали в ФБР и один раз в дистиллированной воде, заключали в глицерин. Измерения проводили на микроскопе NanoFinder HighEnd, $\lambda_{\text{возб}} = 532$ нм. Флуоресцентная микроскопия проводилась на 18 образцах (по шесть от трех доноров).

Распределение МУНТ в нейтрофилах определяли после 30 мин инкубирования клеток с ними при температуре 37 °С методом КР-спектроскопии. Сканирование зафиксированных в параформальдегиде клеток, как описано выше, на кремниевых подложках осуществляли на КР-микроскопе NanoFinder HighEnd с использованием лазера с $\lambda = 532$ нм (3.2 мВт). Время экспозиции 30.0 с, шаг сканирования 2.0 мкм. При записи отдельных КР-спектров МУНТ и нейтрофилов спектры трижды регистрировали в одной точке для получения лучшего отношения сигнал/шум. Для каждого образца спектры измерены в не менее трех точках. Затем спектры усредняли.

При математической обработке результатов ИИ ХЛ определяли среднюю величину для группы независимых измерений (от трех до шести). Для проверки значимости различий при сравнении данных в двух группах использовали *t*-критерий Стьюдента, определяли уровни значимости разли-

чий (p). Различия считали достоверными при $p < 0.05$. Данные представляли с помощью программных пакетов OriginPro 8.0 (OriginLab Corp., USA) и Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. При добавлении к нейтрофилам МУНТ-СООН и МУНТ-СООН/ДНК зарегистрирована реорганизация актинового цитоскелета клеток — полимеризация глобулярного актина (G-актина) до фибриллярного (F-актина). Из рис. 1, *a* (1, 4) видно, что при адгезии к стеклу в нейтрофилах появляются небольшие очаги конденсации F-актина. В присутствии комплексов МУНТ-СООН/ДНК (2, 3) и МУНТ-СООН (5, 6) нейтрофилы, адгезирующие к стеклу, продолжают активироваться: усиливается распластывание клеток, появляются очаги конденсации F-актина, формируются филоподии и ламеллоподии. Для предотвращения стимулирующего действия адгезии на нейтрофилы реорганизацию актинового цитоскелета исследовали в суспензии клеток. Как видно из рис. 1, *б*, при действии комплексов МУНТ-СООН/ДНК (2, 3) и МУНТ-СООН (5, 6) на нейтрофилы в суспензии также происходит реорганизация цитоскелета клеток, о чем свидетельствуют увеличение размеров клеток, появление очагов конденсации и повышение концентрации фибриллярного актина, которое визуализируется по возрастанию интенсивности флуоресценции красителя 532 Phalloidin.

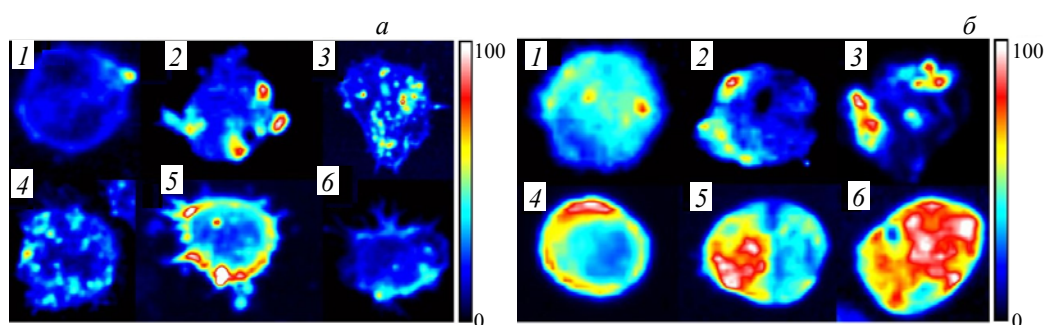


Рис. 1. Распределение фибриллярного актина в нейтрофилах, стимулированных адгезией к стеклу (*a*), и нейтрофилах в суспензии (*б*) при действии МУНТ: 40 нг/мл ДНК (1), 40 нг/мл МУНТ-СООН/ДНК (2), 400 нг/мл МУНТ-СООН/ДНК (3), контроль с NaCl (4), 100 нг/мл МУНТ-СООН (5), 1 мкг/мл МУНТ-СООН (6)

Поскольку на рис. 1 видны участки концентрации F-актина овальной и округлой формы, предположено, что МУНТ-СООН и МУНТ-СООН/ДНК фагоцитируются нейтрофилами. Для визуализации комплексов УНТ в нейтрофилах применен метод конфокальной сканирующей КР-микроскопии. На рис. 2 представлены изображения и КР-спектр зафиксированного параформальдегидом нейтрофила в отсутствие МУНТ. На рис. 2, *в* отмечены линии 1465 и 1669 см^{-1} , соответствующие МПО с окисленным редокс-центром, линии 1167 и 1399 см^{-1} — цитохрому b_{558} (субъединица НАДФН-оксидазного комплекса) с окисленным редокс-центром [36, 37]. Следовательно, основной вклад в спектр КР нейтрофилов вносят МПО и цитохром b_{558} .

На рис. 3 представлены спектры КР нейтрофилов после 30 мин инкубирования с комплексами МУНТ-СООН/ДНК. Видно, что спектры КР нейтрофила на рис. 2, *в* и 3, *в* различаются. В результате взаимодействия нейтрофилов с МУНТ-СООН/ДНК происходит сдвиг характерных линий в КР-спектрах клеток (рис. 3, *в*): линии МПО сдвигаются до 1451 и 1651 см^{-1} , цитохрома b_{558} — до 1143 и 1385 см^{-1} . Это свидетельствует о более восстановленном по сравнению с рис. 2 состоянии редокс-центров как МПО, так и цитохрома b_{558} [38, 39].

На подложке рядом с клетками находятся структуры меньших размеров, КР-спектр которых приведен на рис. 3, *з*. Наличие в этом спектре характерных линий 1333 , 1592 и 2701 см^{-1} свидетельствует о присутствии МУНТ-СООН/ДНК комплексов, линии являются D -, G - и $2D$ -модами (рис. 3, *д*). Однако интенсивности и форма данных характерных линий МУНТ-СООН/ДНК в контрольном образце (рис. 3, *д*) и во внеклеточном пространстве (рис. 3, *з*) различаются. Видно, что интенсивность D -моды высока в контроле, что показывает наличие дефектов в структуре УНТ, которые возникают после функционализации СООН-группами и ДНК. При этом после взаимодействия с нейтрофилами D -мода МУНТ-СООН/ДНК сильно уменьшается, что свидетельствует об уменьшении количества структурных дефектов на поверхности МУНТ. Это, вероятно, обусловлено разрушением внешних дефектных слоев нанотрубок под действием гипохлорит-ионов, образующихся при участии МПО [39].

Обнаруженные на подложке структуры не являются просто агломератами МУНТ-СООН/ДНК. Линии в их КР-спектре (рис. 3, *з*) характерны не только для МУНТ, но и для компонентов нейтрофила: 1133 см^{-1} (Phe C-H), 1244 см^{-1} (Амид III), 2338 см^{-1} (S-H) — белков, 1165 см^{-1} (C, G, A), 1379 см^{-1} (T, A, G) — ДНК, 2901 см^{-1} (CH_2) — липидов [40], т. е. в данных агломератах помимо МУНТ-СООН/ДНК присутствуют белки.

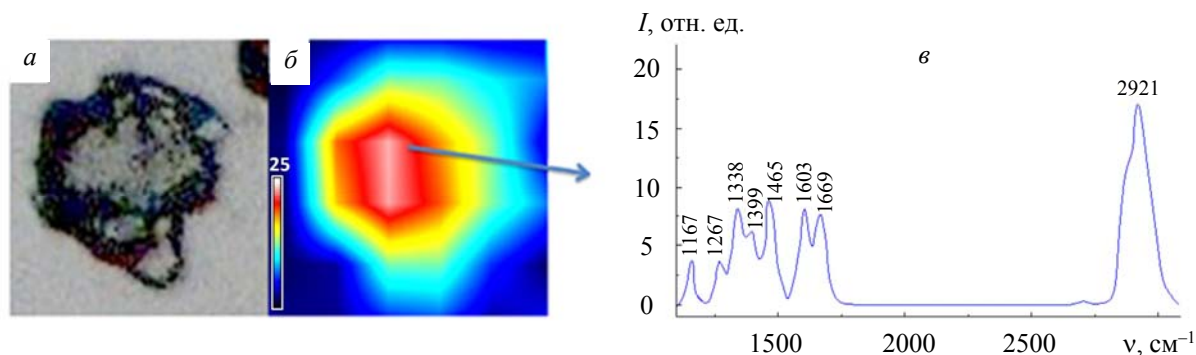


Рис. 2. Типичные изображения: *a* — световая микроскопия, *б* — конфокальная сканирующая микроскопия КР (изображение восстановлено с использованием диапазона 2700—3000 см^{-1} , цветовая шкала в отн. ед.) и спектр КР (*в*) нейтрофила

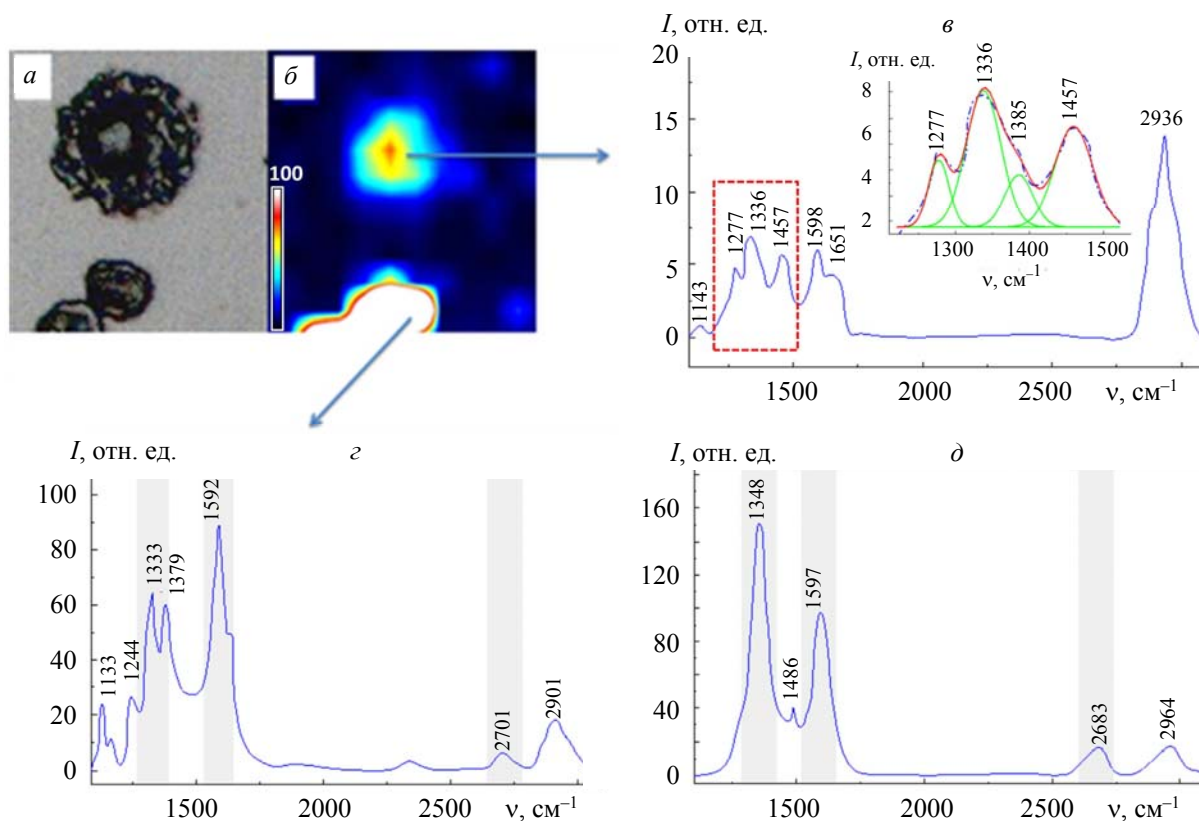


Рис. 3. Типичные изображения нейтрофила после инкубирования с МУНТ-СООН/ДНК: *a* — световая микроскопия, *б* — конфокальная сканирующая микроскопия КР (изображение восстановлено с использованием диапазона 2700—3000 см^{-1} , цветовая шкала в отн. ед.), *в* — спектр КР нейтрофилов в присутствии МУНТ-СООН/ДНК (концентрация 40 нг/мл , время инкубирования 30 мин), вставка — результат разложения выделенного участка спектра на гауссовы компоненты, *з* — спектр КР агрегата МУНТ-СООН/ДНК (вблизи нейтрофила), *д* — спектр КР МУНТ-СООН/ДНК, осажденного из суспензии без клеток

При инкубировании нейтрофилов с МУНТ-СООН не зарегистрировано комплексов наноструктур на поверхности или рядом с клетками. Следовательно, МУНТ-СООН не фагоцитируются клетками и смываются с подложки при подготовке образцов.

При активации нейтрофилов перестройка цитоскелета необходима для сборки НАДФН-оксидазного комплекса, что приводит к генерации АФК, секреторной дегрануляции и формированию НВЛ. Установлено, что добавление МУНТ к нейтрофилам приводит к изменению способности нейтрофилов генерировать АФК и АФХ. Как видно из табл. 1, при действии МУНТ-СООН на нейтрофилы в суспензии регистрируется усиление генерации свободнорадикальных продуктов клетками. ИИ люм-ХЛ увеличивается на 22 ± 9 %, а ИИ люц-ХЛ на 82 ± 13 %, что свидетельствует об активации НАДФН-оксидазы. Показано, что добавление к нейтрофилам комплексов МУНТ-СООН/ДНК не приводит к изменению по сравнению с контролем продукции супероксидных анион-радикалов и только на 19 ± 11 % усиливает суммарный выход АФК и АФХ. В то же время в присутствии МУНТ-СООН снижается продукция супероксидных анион-радикалов нейтрофилами, стимулированными адгезией к стеклу и fMLP на 16 ± 6 и 35 ± 10 %. При этом не регистрируется достоверное изменение суммарного количества генерируемых клетками активных метаболитов (табл. 1). ИИ люц-ХЛ нейтрофилов снижается и при действии МУНТ-СООН/ДНК. Из табл. 1 видно, что относительно контрольных измерений ИИ люм-ХЛ при адгезии клеток 75 ± 11 % уменьшается в два раза при дополнительной стимуляции fMLP. Следует отметить, что форма кинетических кривых ХЛ фагоцитов при действии МУНТ не изменяется.

Т а б л и ц а 1. Интегральная интенсивность хемилюминесценции в системах, содержащих нейтрофилы, при действии комплексов МУНТ

Образец	Стимуляция клеток адгезией		Стимуляция клеток при адгезии fMLP		Клетки в суспензии		Секреция МПО
	Люц-Хл	Люм-Хл	Люц-Хл	Люм-Хл	Люц-Хл	Люм-Хл	
МУНТ-СООН/ДНК 40 нг/мл	$78 \pm 8^*$	$75 \pm 11^*$	$47 \pm 11^{**}$	$47 \pm 14^{**}$	98 ± 5	$119 \pm 11^*$	$75 \pm 15^{**}$
МУНТ-СООН 100 нг/мл	$84 \pm 6^*$	98 ± 7	$65 \pm 10^{**}$	101 ± 7	$182 \pm 13^{**}$	$122 \pm 9^*$	$50 \pm 20^{**}$

П р и м е ч а н и е. Данные представлены в % от контроля в виде среднего \pm стандартное отклонение; за 100 % принята ИИ ХЛ нейтрофилов при добавлении раствора NaCl (контроль для МУНТ-СООН) и ДНК в NaCl (контроль для МУНТ-СООН/ДНК).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

При активации нейтрофилов инициируется секреторная дегрануляция — выход содержимого гранул фагоцитов во внеклеточное пространство. Оценена секреция МПО (фермента гранул) клетками после инкубирования с МУНТ. Из табл. 1 видно, что ИИ люм-ХЛ, характеризующая наличие МПО в супернатанте клеток, меньше почти в два раза в присутствии обоих типов комплексов МУНТ. Это может быть обусловлено снижением либо секреции МПО во внеклеточное пространство, либо активности данного фермента в присутствии МУНТ.

Таким образом, комплексы МУНТ-СООН, но не МУНТ-СООН/ДНК способны активировать нейтрофилы, что проявляется в усилении полимеризации актина (рис. 1, б (5, 6)) и генерации АФК и АФХ. Однако эти нанобъекты не фагоцитируются клетками. Наблюдается фрустрированный фагоцитоз, когда нейтрофил не может поглотить объект фагоцитоза, а процессы активации клетки уже запущены. Фрустрированный фагоцитоз является сильным провоспалительным стимулом, приводящим к увеличению концентрации провоспалительных цитокинов и усилению окислительного стресса в тканях [41]. Такой механизм описан для макрофагов, взаимодействующих с МУНТ в плевральной полости [42], и эффективность фагоцитоза и генерации окислителей зависит от размера агрегата, функционализации и аспектного отношения МУНТ, наличия ионов металлов [25, 26, 43]. В исследованиях *in vivo* [26] показано, что короткие и длинные (>10 мкм) МУНТ диаметром <20 нм могут проникать в клетки и формировать в цитоплазме агрегаты. Длинные МУНТ диаметром >100 нм распознаются макрофагами, но их фагоцитирование неполное, что обусловлено большой длиной нанотрубок. Макрофаги в плевральном пространстве атакуют крупные УНТ и безуспешно пытаются погло-

тить их, происходит фрустрированный фагоцитоз [42]. Используются короткие (100—300 нм, диаметр 20 нм) МУНТ, которые могут фагоцитироваться макрофагами. Однако нейтрофилы меньше по размеру и не настолько эффективны при захвате МУНТ, как макрофаги. В процессе работы с МУНТ-СООН отмечено, что в суспензии они образуют значительно большие агрегаты, чем МУНТ-СООН/ДНК. Возможно, взаимодействие нейтрофилов с такими агрегатами в суспензии и приводило к фрустрированному фагоцитозу и усилению процессов активации молекулярного кислорода.

Фагоцитоз не зарегистрирован при добавлении комплексов МУНТ к клеткам при адгезии и действии хемотаксического пептида, где процесс генерации активных интермедиатов запущен. Добавление комплексов МУНТ к таким клеткам приводило к уменьшению продукции АФК и АФХ. Вероятно, МУНТ-СООН и МУНТ-СООН/ДНК индуцируют перестройку внутриклеточных сигнальных путей и/или взаимодействуют со свободнорадикальными продуктами [44].

Известно, что в зависимости от структуры, наличия примесей (ионов металлов-катализаторов), длины и функционализации УНТ могут оказывать различное АФК-опосредованное действие на клетки. Воздействие МУНТ-СООН, содержащих Со и Ni, приводит к снижению жизнеспособности клеток, изменению потенциала на митохондриальной мембране в макрофагах крыс (NR8383) и клетках A549 [45]. Выявлено усиление апоптоза, повреждение ДНК, активация MAPK, AP-1, NF-κB и Akt в нормальных и злокачественных мезотелиальных клетках человека при действии ОУНТ [24]. МУНТ вызывают перекисное окисление липидов в макрофагах RAW 264.7 и клетках A549 [46]. Показано, что воздействие МУНТ приводит к активации молекулярного кислорода в макрофагах. При этом пегилированные МУНТ приводят к меньшей продукции АФК посредством активации НАДФН-оксидазы по сравнению с МУНТ-СООН, о чем свидетельствует мембранная транслокация p47phox и p67phox [25].

Генерация АФК и АФХ нейтрофилами при действии МУНТ сопряжена со взаимодействием МПО и НОС1 во внеклеточной среде с МУНТ, что приводит к изменению отношения D/G мод в спектрах КР и свидетельствует об изменении кристаллической структуры МУНТ. Биодegradация УНТ в нейтрофилах при участии МПО и образуемых ею свободнорадикальных продуктов описана в [39, 47].

При сравнении спектров КР нейтрофилов в контроле и после взаимодействия с МУНТ регистрируется смещение линий, характеризующих состояние основных АФК- и АФХ-генерирующих ферментов — b_{558} и МПО. Показано, что сдвиг линий КР в синюю область происходит при восстановлении этих ферментов [36—39]. Известно, что при генерации АФК осуществляется окисление железа в активном центре МПО и b_{558} [38, 39, 48], т. е. преобладают комплексы фермента в окисленной форме. Это наблюдается при активации нейтрофилов адгезией (рис. 2). При добавлении МУНТ к клеткам снижение продукции кислородных интермедиатов положительно коррелирует с наличием МПО и b_{558} в более восстановленном состоянии, которое регистрируется методом КР. Следовательно, с помощью метода КР можно оценивать состояние АФК- и АФХ-генерирующих систем нейтрофилов.

Таким образом, взаимодействие МУНТ-СООН/ДНК с нейтрофилами инициирует процесс образования НВЛ. Показано, что структуры подобного рода образуются при взаимодействии нейтрофилов с окисленным графеном [49] и ОУНТ [23]. При этом компоненты НВЛ способствуют деградации углеродных наноматериалов: эластаза разрушает полиэтиленгликолевую оболочку УНТ [50], а МПО, катализируя образование хлорноватистой кислоты и гипохлорит-ионов, разрушает углеродный каркас [47, 51].

Заключение. Короткие (100—300 нм) многостенные углеродные нанотрубки, функционализированные —СООН-группами и в комплексах с ДНК, при взаимодействии с нейтрофилами вызывают реорганизацию цитоскелета клеток, не фагоцитируются, но модифицируют кислородоактивирующую способность фагоцитов. Взаимодействие нейтрофилов с МУНТ-СООН/ДНК приводит к образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек с включением этих наноструктур. Свободнорадикальные продукты, генерируемые нейтрофилами, нарушают кристаллическую структуру многостенных углеродных нанотрубок.

При использовании наноматериалов в качестве противоопухолевых препаратов необходимо учитывать их взаимодействие с иммунными клетками, присутствующими в крови и инфильтрующими опухоль, так как промежуточное взаимодействие углеродных нанотрубок с нейтрофилами и макрофагами может снизить эффективность использования углеродных нанотрубок для термической абляции клеток опухоли за счет изменения кристаллической структуры углеродных нанотрубок и их физико-химических свойств, или индуцировать процессы воспаления. Структура, тип функционализации и размеры углеродных нанотрубок в значительной мере определяют характер их взаимо-

действия с клетками крови. Присутствие ДНК в структуре комплексов наноматериалов может провоцировать формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек. Таким образом, КР-спектроскопия является эффективным методом исследования АФК- и АФА-генерирующих систем клеток и диагностики структуры углеродных нанотрубок при взаимодействии с нейтрофилами.

- [1] K. D. Patel, R. K. Singh, H.-W. Kim. *Mater. Horiz.*, **6** (2019) 434—469
- [2] M. Taale, F. Schütt, K. Zheng, Y. Kumar Mishra, A. R. Boccaccini, R. Adelung, C. Selhuber-Unkel. *ACS Appl. Mat. Interf.*, **10**, N 50 (2018) 43874—43886
- [3] H. V. Grushevskaya, V. V. Hrushevsky, N. G. Krylova, T. A. Kulahava, I. V. Lipnevich, T. I. Orekhovskaya, G. N. Semenkova, B. G. Shulitsky. *Int. J. Nonlin. Phen. in Complex Sys.*, **13**, N 4 (2010) 396—408
- [4] I. A. Chelnokova, L. N. Golubewa, M. N. Starodubtseva, T. A. Kulahava, Y. N. Kunitskaya, P. M. Bulai, I. E. Starodubtsev, Yu. S. Kharin, M. V. Shuba. *J. Nanopart. Res.*, **22**, N 144 (2020)
- [5] Е. Н. Голубева, М. В. Шуба, Н. В. Васильев, Т. А. Кулагова. *Журн. прикл. спектр.*, **85**, № 6 (2018) 999—1005 [E. N. Golubewa, M. V. Shuba, M. V. Vasilieu, T. A. Kulahava. *J. Appl. Spectr.*, **85**, N 6 (2018) 1121—1127]
- [6] L. Golubewa, T. Kulahava, Y. Kunitskaya, P. Bulai, M. Shuba, R. Karpicz. *BBRC*, **529**, N 3 (2020) 647—651
- [7] B. S. Wong, S. L. Yoong, A. Jagusiak, T. Panczyk, H. K. Ho, W. H. Ang, G. Pastorin. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **65**, N 15 (2013) 1964—2015
- [8] A. M. Elhissi, W. Ahmed, I. U. Hassan, V. R. Dhanak, A. D'Emanuele. *J. Drug Deliv.* (2012) 837327
- [9] H. K. Moon, S. H. Lee, H. C. Choi. *ACS Nano*, **3**, N 11 (2009) 3707—3713
- [10] L. Golubewa, I. Timoshchenko, O. Romanov, R. Karpicz, T. Kulahava, D. Rutkauskas, M. Shuba, A. Dementjev, Y. Svirko, P. Kuzhir. *Sci. Rep.*, **10**, N 1 (2020) 22174
- [11] E. Kolaczowska, P. Kubes. *Nat. Rev. Immunol.*, **13** (2013) 159—175
- [12] Е. И. Коваленко, Г. Н. Семенкова, С. Н. Черенкевич. *Цитология*, **49**, N 10 (2007) 837—847
- [13] G. N. Semenkova, S. N. Cherenkevich, V. I. Levin, A. I. Svirnovskii. *Biofizika*, **30**, N 5 (1985) 864—867
- [14] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky. *Science*, **303** (2004) 1532—1535
- [15] V. Papayannopoulos. *Nat. Rev. Immunol.*, **18** (2018) 134—147
- [16] В. Н. Мальцева, В. Г. Сафронова. *Цитология*, **51**, N 6 (2009) 467—474
- [17] M. Graf, R. Prins, R. Merchant. *J. Immunol.*, **166** (2001) 121—129
- [18] E. Di Carlo, G. Forni, P. L. Lollini, M. P. Colomobo, A. Modesti, P. Musiani. *Blood*, **97** (2001) 339—345
- [19] K. Watari, A. Tojo, T. Nagamura-Inoue, M. Matsuoka, S. Irie, K. Tani, Y. Yamada, S. Asano. *Cancer*, **89** (2000) 551—560
- [20] Z. Sun, P. Yang. *Lancet Oncol.*, **5** (2004) 182—190
- [21] Q. D. Wu, J. H. Wang, C. Condron, D. Bouchier-Hayes, H. P. Redmond. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **280** (2001) 814—822
- [22] S.-C. Hung, N. Rajasekaran, S. Zhu, Z. Ma, E. Ghosn, E. D. Mellins. *J. Immunol.*, **200**, 1 Suppl. (2018) 175.23
- [23] C. Farrera, K. Bhattacharya, B. Lazzaretto, F. T. Andón, K. Hultenby, G. P. Kotchey, A. Star, B. Fadeel. *Nanoscale*, **6** (2014) 6974—6983
- [24] M. Pacurari, X. J. Yin, J. Zhao, M. Ding, S. S. Leonard, D. Schwegler-Berry, B. S. Ducatman, D. Sbarra, M. D. Hoover, V. Castranova, V. Vallyathan. *Environ. Health Perspect.*, **116**, N 9 (2008) 1211—1217
- [25] Y. Jiang, H. Zhang, Y. Wang, M. Chen, S. Ye, Z. Hou, L. Ren. *PLoS One.*, **8**, N 6 (2013) e65756
- [26] F. A. Murphy, C. A. Poland, R. Duffin, K. T. Al-Jamal, H. Ali-Boucetta, A. Nunes, F. Byrne, A. Prina-Mello, Y. Volkov, S. Li, S. J. Mather, A. Bianco, M. Prato, W. MacNee, W. A. Wallace, K. Kostarelos, H. Donaldson. *Am. J. Pathol.*, **178** (2011) 2587—2600
- [27] M. S. P. Boyles, L. C. Stoehr, P. Schlinkert, M. Himly, A. Duschl. *Fibers*, **2**, N 1 (2014) 45—74
- [28] I. Fenoglio, E. Aldieri, E. Gazzano, F. Cesano, M. Colonna, D. Scarano, G. Mazzucco, A. Attanasio, Y. Yakoub, D. Lison, B. Fubini. *Chem. Res. Toxicol.*, **25**, N 1 (2012) 74—82

- [29] J. Dong, D. W. Porter, L. A. Batteli, M. G. Wolfarth, D. L. Richardson, Q. Ma. *Arch. Toxicol.*, **89**, N 4 (2015) 621—633
- [30] M. V. Shuba, A. G. Paddubskaya, P. P. Kuzhir, S. A. Maksimenko, V. Ksenevich, G. Niaura, D. Seliuta, I. Kašalynas, G. Valusis. *Nanotechnol.*, **23** (2012) 495714
- [31] Н. В. Глебова, А. А. Нечитайлов. *Письма в ЖТФ*, **36**, N 19 (2010) 45—50
- [32] Н. В. Васильев, М. В. Шуба, Е. Н. Голубева, Т. А. Кулагова, С. Н. Черенкевич. Сб. статей XII съезда БООФИБ “Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем”, 28—30 июня 2016 г., **2**, Минск, изд. центр БГУ (2016) 229—233
- [33] A. Boyum. *Tissue Antigens*, **4** (2004) 269—274
- [34] Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурина. *Успехи биол. химии*, **49** (2009) 341—388
- [35] T. Kuznetsova, T. Kulahava, I. Zholnerevich, N. Amaegberi, G. Semenkova, O. Shadyro, J. Arnold. *Mol. Immunol.*, **87** (2017) 317—324
- [36] C. G. Atkins, K. Buckley, M. W. Blades, R. F. B. Turner. *Appl. Spectrosc.*, **71**, N 5 (2017) 767—793
- [37] N. M. Sijtsema, A. G. J. Tibbe, G. M. J. Segers-Nolten, A. J. Verhoeven, R. S. Weening, J. Greve, C. Otto. *Biophys. J.*, **78** (2000) 2606—2613
- [38] H. J. Van Manen, N. Uzunbajakava, R. van Bruggen, D. Roos, C. Otto. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, N 40 (2003) 12112—12113
- [39] A. G. Masyutin, D. V. Bagrov, I. I. Vlasova, I. I. Nikishin, D. V. Klinov, K. A. Sychevskaya, G. E. Onishchenko, M. V. Erokhina. *Nanomaterials*, **8**, N 9 (2018) 715
- [40] D. W. Shipp, F. Sinjab, I. Notingher. *Adv. Opt. Photonic.*, **9**, N 2 (2017) 315—428
- [41] V. Jaumouillé, S. Grinstein. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **23** (2011) 22—29
- [42] M. S. Boyles, L. Young, D. M. Brown, L. MacCalman, H. Cowie, A. Moisala, F. Smail, P. J. Smith, L. Proudfoot, A. H. Windle, V. Stone. *Toxicol. In Vitro*, **29**, N 7 (2015) 1513—1528
- [43] I. Fenoglio, E. Aldieri, E. Gazzano, F. Cesano, M. Colonna, D. Scarano, G. Mazzucco, A. Attanasio, Y. Yakoub, D. Lison, B. Fubini. *Chem. Res. Toxicol.*, **25**, N 1 (2012) 74—82
- [44] K. Futosi, S. Fodor, A. Mócsai. *Int. Immunopharmacol.*, **17**, N 3 (2013) 638—650
- [45] K. Pulskamp, S. Diabaté, H. F. Krug. *Toxicol. Lett.*, **168**, N 1 (2007) 58—74
- [46] B. Chen, Y. Liu, W. M. Song, Y. Hayashi, X. C. Ding, W. H. Li. *Biomed. Environ. Sci.*, **24**, N 6 (2011) 593—601
- [47] A. Shvedova, A. Pietroiusti, B. Fadeel, V. Kagan. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **261**, N 2 (2012) 121—133
- [48] J. K. Hurst, T. M. Loehr, J. T. Curnutte, H. Rosen. *J. Biol. Chem.*, **266** (1991) 1627—1634
- [49] S. P. Mukherjee, B. Lazzaretto, K. Hultenby, L. Newman, A. F. Rodrigues, N. Lozano, K. Kostarelos, P. Malmberg, B. Fadeel. *J. Chem.*, **4** (2018) 334—358
- [50] K. Bhattacharya, C. Sacchetti, R. El-Sayed, A. Fornara, G. P. Kotchey, J. A. Gaugler, A. Star, M. Bottini, B. Fadeel. *Nanoscale*, **6** (2014) 14686—14690
- [51] S. Keshavan, P. Calligari, L. Stella, L. Fusco, L. G. Delogu, B. Fadeel. *Cell Death & Disease*, **10**, N 8 (2019) 569