

УДК 57.086

ИДЕНТИФИКАЦИЯ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ МЕТОДАМИ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2023 г. А. Г. Масютин^{1, 2, *}, Е. К. Тарасова², Г. Е. Онищенко¹, М. В. Ерохина^{1, 2}

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Биологический факультет,
Кафедра клеточной биологии и гистологии, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза”,
Отдел патоморфологии, клеточной биологии и биохимии, Москва, Россия

*E-mail: squiggoth@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 22.05.2023 г.

Принята к публикации 28.06.2023 г.

Углеродные наночастицы — распространенный тип наночастиц, идентификация которых в биологических образцах сопряжена с наибольшими трудностями. Продемонстрировано, что надежным и релевантным инструментом идентификации углеродных наночастиц в биологических образцах является применение стандартной трансмиссионной электронной микроскопии в сочетании с методом дифракции электронов.

DOI: 10.31857/S0367676523702460, EDN: PJZMVK

ВВЕДЕНИЕ

Углеродные наночастицы (УНЧ) — один из широко распространенных типов наночастиц, контакт человека с которыми наиболее вероятен. Существуют как природные источники УНЧ — вулканические выбросы, наночастицы в составе космической пыли [1], так и антропогенные. В окружающую среду попадают преимущественно УНЧ антропогенного происхождения — в результате их широкого применения в разных сферах (производство электроники, проводников и фотоэлементов, строительных и композитных материалов [2, 3], сгорания углеводородного топлива [4]).

Визуализация и идентификация УНЧ в биологических образцах сопряжена с рядом трудностей. Во-первых, существуют методические ограничения: биологические образцы состоят преимущественно из углерода и элементный анализ, например, энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДС), не позволяет достоверно определить в них УНЧ. Во-вторых, в клетках и тканях присутствуют включения разной химической природы, которые также необходимо отличить от искомым наночастиц [5]. В-третьих, необходимо различать между собой и сами УНЧ, которые достаточно разнообразны и могут вызывать разные последствия при контакте с живыми организмами [6]. В связи с этим, методы

трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) для идентификации УНЧ в биологических образцах могут быть наиболее релевантными, так как они позволяют не только изучать ультраструктуру клеток и тканей, но также исследовать внутриклеточную локализацию УНЧ и их морфологию [7].

Углеродные наночастицы, к которым относятся нанотрубки, фуллерены, наночастицы алмаза, графен, нанорожки и другие — различаются между собой прежде всего своей кристаллической структурой [8]. Именно для изучения кристаллической структуры применяется один из методов аналитической электронной микроскопии — дифракция электронов. Данный метод широко используется в кристаллографии. Его принцип заключается в том, что при прохождении через кристаллическую решетку вещества, электроны дифрагируют. Результатом этого процесса является формирование специфической дифракционной картины (электронограммы), уникальной для каждого обладающего кристаллической структурой вещества. Таким образом, данный метод может быть использован для идентификации разных УНЧ на ультратонких срезах биологических образцов [9]. В свою очередь, стандартная ТЭМ позволяет достичь разрешения в несколько ангстрем, что дает возможность изучать морфологию даже одиночных наночастиц [10]. Эти воз-

возможности стандартной и аналитической ТЭМ были апробированы для выявления УНЧ в биологических образцах с целью отличить их от электронно-плотных скоплений разной природы. Для реализации цели исследования была поставлена задача провести морфологический анализ и идентификацию многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ), фуллерена C_{60} и наночастиц алмаза, используя комбинацию методов стандартной ТЭМ и дифракции электронов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие наночастицы: МУНТ “Таунит” (ООО “НаноТехЦентр”, Тамбов, Россия; частицы “Фуллерен C_{60} ” (ЗАО “Фуллерен-центр”, Нижний Новгород); ультрадисперсные синтетические детонационные алмазы марки “УДА-СП” НП ЗАО “Синта” (Минск, Беларусь).

В качестве модельного объекта в работе использовали клеточную линию ТНР-1 (Российская коллекция клеточных культур, НИИ Цитологии, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Москва, Россия) с добавлением 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Москва, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Инкубацию клеток проводили при 37°C и 5% CO_2 . Экспериментальная концентрация клеток составляла 500 000 клеток на 1 мл среды. Макрофагальную дифференцировку индуцировали добавлением в среду культивирования 10^{-7} М форболового эфира (Sigma, США). Наночастицы в виде водной суспензии (50 мкг/мл) добавляли к клеткам через 72 ч дифференцировки, согласно ранее полученным данным о фагоцитарной активности макрофагов ТНР-1 [11]. Клетки инкубировали с наночастицами в течение 48 ч.

Наночастицы C_{60} вводили внутрибрюшинно мышам линии C57Bl/6 $\times$ DBA/2 (получены из виварно-экспериментального комплекса ООО “НИИ Митотехнологии МГУ”) в концентрации 250 мг на 1 кг веса животного в виде суспензии, приготовленной на основе изотонического раствора хлорида натрия и подвергнутой ультразвуковой обработке. Через 4 ч после инъекции, животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира и для анализа использовали брыжейку и селезенку.

Исследование ультраструктуры клеток и тканей проводили по стандартной методике [12]. Образцы промывали 0.1 М фосфатным буфером (pH 7.2–7.4) и фиксировали 2.5% глutarовым альдегидом (TedPella, INC) на 0.1 М фосфатном буфере в течение 2 ч. Далее отмывали от фиксатора и дофиксировали 1% раствором тетраоксида осмия (OsO_4) в течение 2 ч на +4°C. Обезвоживание образцов производили в спиртах восходящей концентрации (50, 60, 70% с 2% уранилацетата, 80, 96,

100%) и ацетоне, после чего заключали в эпоксидную смолу. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LEICA UCT 4 (Leica, Германия). Дополнительное контрастирование срезов проводили 2% водным раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу [13]. Для первичного поиска наночастиц на ультратонких срезах (60–80 нм) отдельные образцы не подвергали контрастированию по Рейнольдсу. Препараты исследовали с помощью аналитического электронного микроскопа “JEM 2100” (Jeol, Япония) (200 kV, non-corrected, LaB6 cathode). Использовали камеру Gatan FT1000 2k (Gatan, Pleasanton, CA, USA).

Сравнение электронограмм проводили по стандартной методике, описанной в МР 1.2.0045-11 [12] путем совмещения изображений в графическом редакторе Adobe Photoshop CS6 (Adobe, Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Внешний вид УНЧ

и получение эталонных электронограмм

Изображения, полученные с помощью ТЭМ, показали, что наружный диаметр МУНТ составляет 46 ± 15 нм, а внутренний — 9 ± 4 нм (рис. 1а). Наноалмазы представляют собой округлые частицы диаметром 3–5 нм (рис. 1б). Фуллерены имеют размер 1 нм, но в водных средах образуют агрегаты размером от 10 до 500 нм (рис. 1в).

В целях дальнейшей идентификации УНЧ в клетках, методом дифракции электронов были получены их эталонные электронограммы. Последние содержат набор светящихся точек (рефлексов), которые в случае скоплений кристаллов формируют дифракционные кольца. Полученная для МУНТ электронограмма содержит 4 дифракционных кольца (рис. 1г). Электронограмма наночастиц алмаза также имеет четыре кольца (рис. 1д), но их расположение отличается от эталонной электронограммы для МУНТ. Для образца фуллеренов C_{60} характерны три дифракционных кольца (рис. 1е), которые также не совпадают с электронограммами МУНТ и наноалмазов. Таким образом, электронограммы нативных УНЧ различаются между собой по числу и расположению дифракционных колец.

Выявление электронно-плотных наночастиц в биологических образцах при полном и неполном контрастировании ультратонких срезов

Традиционно при использовании ТЭМ проводится полное контрастирование биологического материала солями тяжелых металлов (тетраоксидом осмия, уранилацетатом и цитратом свинца [14]). Уранилацетат контрастирует макромолекулярные структуры, содержащие нуклеиновые кислоты, т.е. нуклеоплазму и рибосомы. При ис-

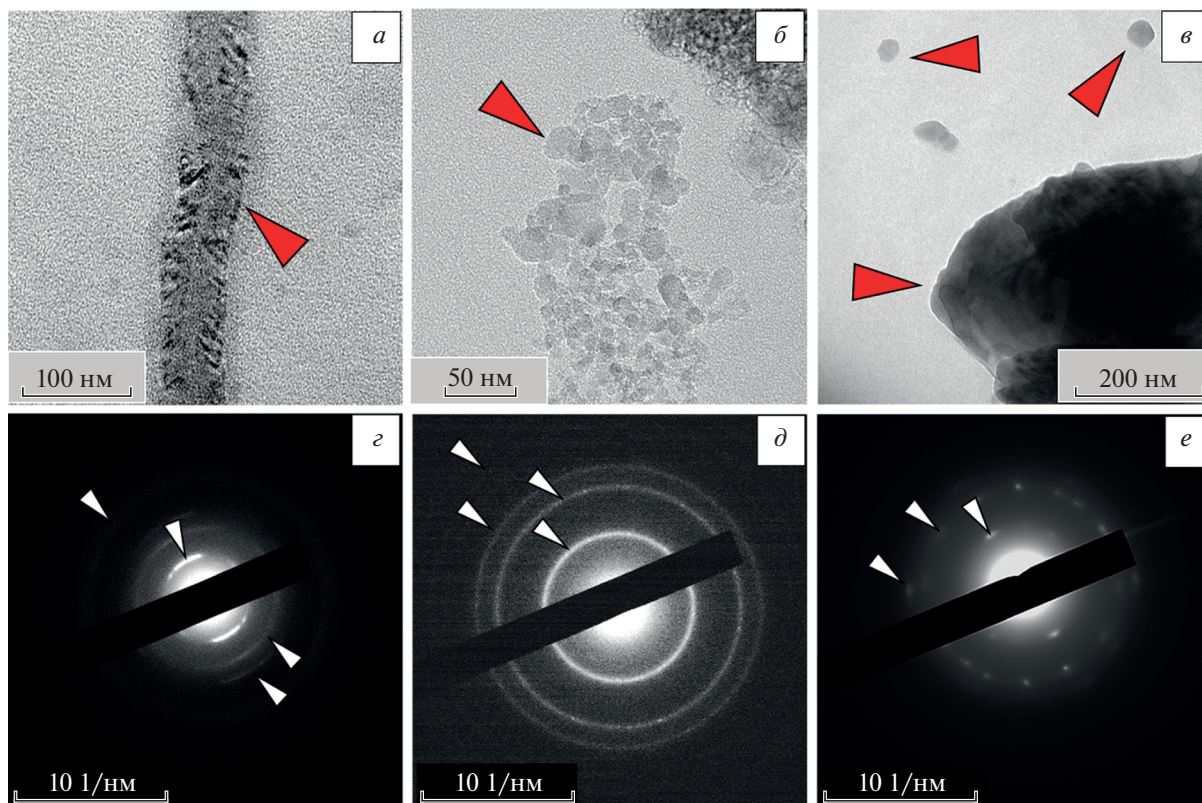


Рис. 1. Сравнение электронограмм разных типов УНЧ. Одиночная МУНТ (а), скопление наночастиц алмаза (б), кластеры наночастиц фуллерена C_{60} (в). Наночастицы показаны красными стрелками. ТЭМ. Электронограммы, полученные для а, б, в, соответственно (з, д, е). Белыми стрелками показаны дифракционные кольца. Дифракция электронов.

пользовании цитрата свинца, ионы свинца связываются с сульфгидрильными и карбоксильными группами в клетках, что приводит к усилению контраста за счет взаимодействия с белками и гликогеном. Тетраоксид осмия имеет химическое сродство к клеточным мембранам и липидным включениям.

Использование всех трех контрастирующих агентов затрудняет поиск одиночных наночастиц из-за снижения разницы в электронной плотности между наночастицами и образцом. Тетраоксид осмия в данном случае является незаменимым, поскольку позволяет визуализировать границы клеток и окруженные мембранами клеточные компартменты.

На рис. 2 представлены скопления частиц с высокой электронной плотностью в клетках при разных вариантах контрастирования. В отличие от полностью контрастированных препаратов (рис. 2а–2в), на срезах с неполным контрастированием, при котором не используется цитрат свинца, (рис. 2г–2е) включения наночастиц визуализируются более отчетливо, при этом остаются видимыми клеточные мембраны. Это позволяет быстро провести первоначальный поиск наночастиц, определить их локализацию в биологических образцах, и в дальнейшем проанализировать

с помощью дифракции электронов для определения их кристаллической структуры.

Идентификация УНЧ в макрофагах ТНР-1

В целях идентификации УНЧ в макрофагах ТНР-1, выявленные внутри клеток электронноплотные включения были исследованы методом дифракции электронов. Далее электронограммы, снятые со скоплений наночастиц МУНТ (рис. 3а) сравнили с электронограмм аминаночастиц алмаза (рис. 3б) и скоплений фуллерена C_{60} (рис. 3в). Как и для нативных наночастиц, дифракционные картины МУНТ (рис. 3г) отличаются расположением и/или количеством дифракционных колец от электронограмм наноалмазов (рис. 3д) и фуллеренов (рис. 3е). Это еще раз демонстрирует высокую специфичность метода дифракции электронов.

Выявление артефактов в биологических образцах

Углеродные наночастицы в крупных и плотных агрегатах могут иметь плохо различимую структуру, что не позволяет идентифицировать их по морфологическим признакам, и их кри-

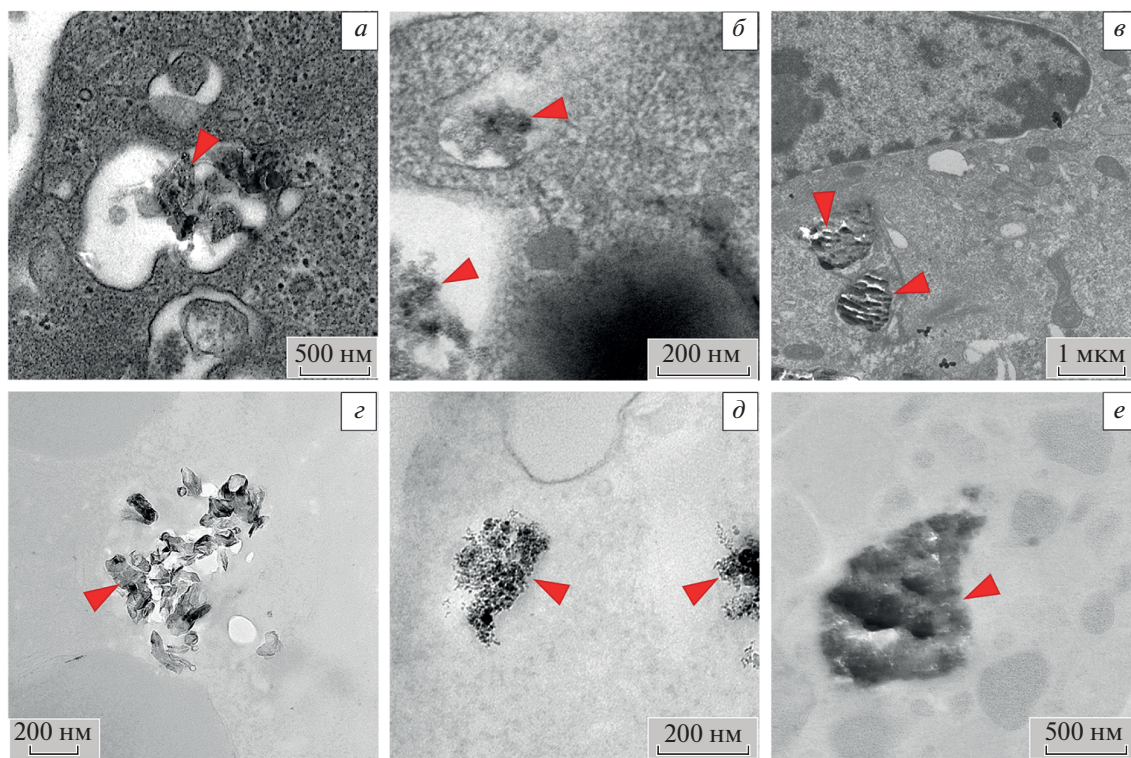


Рис. 2. Электронно-плотные кластеры наночастиц в биологическом материале при разных вариантах контрастирования. *а, б, в* — полное контрастирование (по Рейнольдсу); *г, д, е* — неполное контрастирование; *а, б, г, д* — электронно-плотные наночастицы в макрофагах ТНР-1 после добавления в культуральную среду МУНТ (*а, г*), наноалмазов (*б, д*); *в, е* — скопления наночастиц в клетках брыжейки (*в*) и селезенки (*е*) мыши после внутрибрюшинного введения суспензии фуллеренов C_{60} . Наночастицы показаны стрелками. ТЭМ.

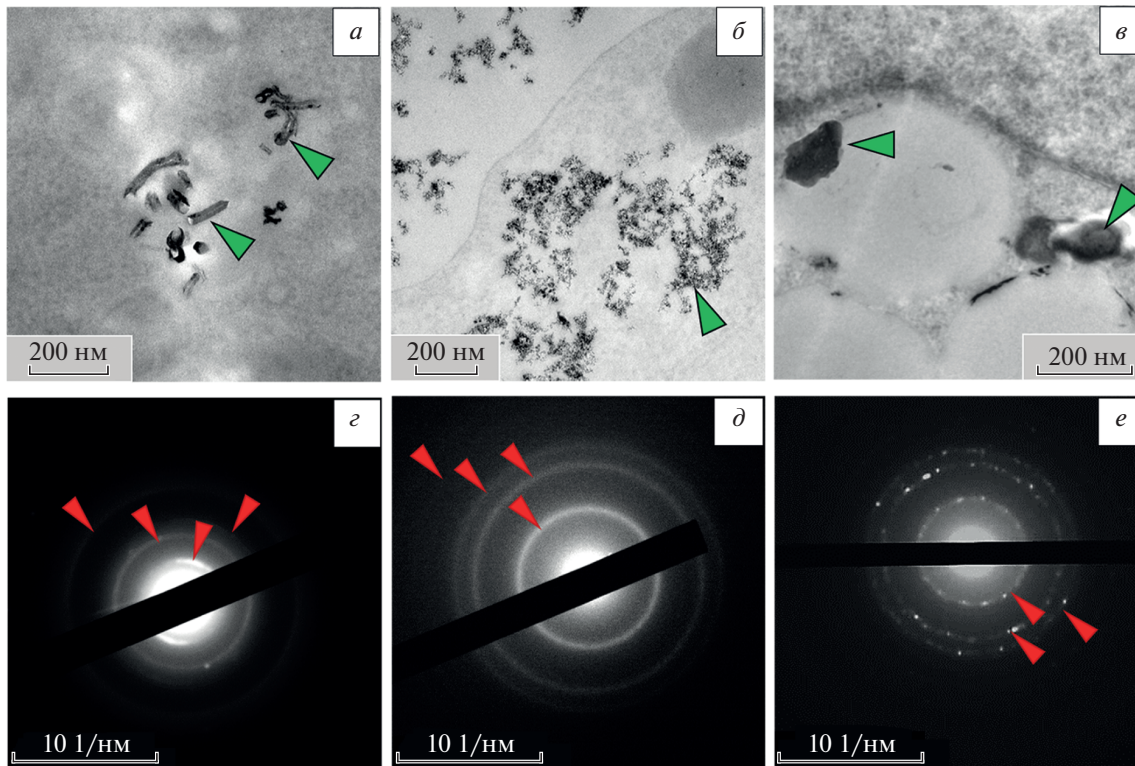


Рис. 3. Сравнение электронограмм, полученных с разных УНЧ в макрофагах ТНР-1. Одиночная МУНТ (*а*), скопление наночастиц алмаза (*б*), кластеры наночастиц фуллерена C_{60} (*в*). Наночастицы показаны зелеными стрелками. Неполное контрастирование. ТЭМ. Электронограммы, полученные для *а, б, в*, соответственно (*г, д, е*). Красными стрелками обозначены дифракционные кольца. Дифракция электронов.

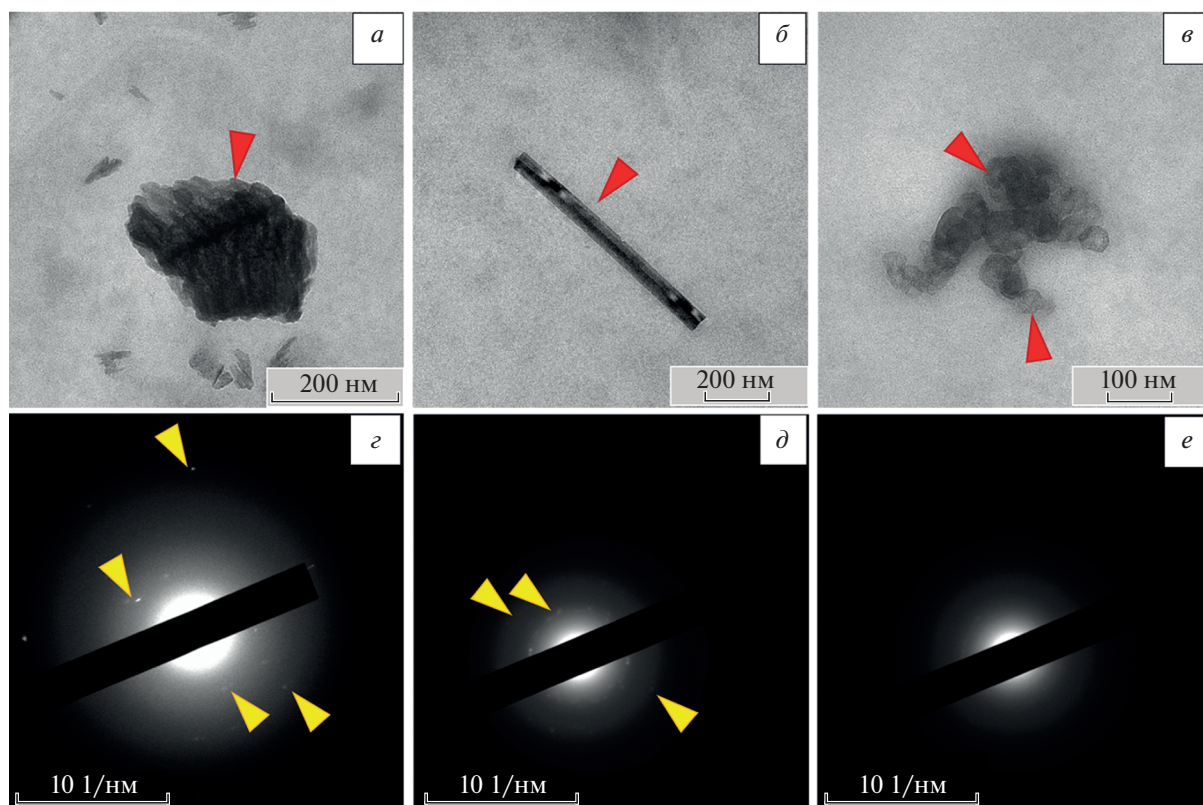


Рис. 4. Электронно-плотные артефакты в макрофагах ТНР-1. Электронно-плотные наноразмерные частицы с кристаллическими свойствами (*а, б*); электронно-плотные некристаллические наночастицы (*в*). Наночастицы показаны красными стрелками; соответствующие *а–в* электронограммы (*з–е*), желтыми стрелками показаны отдельные рефлексy.

сталлическую природу необходимо дополнительно подтверждать. Также не все частицы, выявляемые в клетках и обладающие высокой электронной плотностью, могут являться УНЧ. В связи с этим, все выявленные на ультратонких срезах клеток электронно-плотные частицы исследовали с помощью метода дифракции электронов. Принадлежность наночастицы к УНЧ определяли, получая электронограмму и сравнивая ее с эталонной путем совмещения изображений. Среди выявленных электронно-плотных включений встречаются как кристаллические частицы, не являющиеся искомыми УНЧ (рис. 4*а* и 4*б*) — их электронограммы не совпадают с эталонными (рис. 4*з* и 4*д*), так и некристаллические (рис. 4*в*) — для таких частиц электронограммы представляют собой равномерное гало без дифракционных колец и отдельных рефлексов (рис. 4*е*).

Следует отметить, что в большинстве работ по выявлению наночастиц на ультратонких срезах биологических образцов, основной доказательной базой для их идентификации является поиск частиц с высокой электронной плотностью, по размеру и форме соответствующих исследуемому наноматериалу. При этом совпадение подобных включений с экспериментальными наночастицами зачастую не подтверждается [15]. Такой под-

ход может приводить к некорректной трактовке полученных данных. Использование метода дифракции электронов позволяет провести верификацию выявляемых наночастиц.

В ряде работ наличие наночастиц в биологических образцах подтверждается при помощи использования флуоресцентных меток [16]. Этот метод не всегда подходит для выявления УНЧ, так как при этом изменяются поверхностные свойства наночастиц, что влияет на их взаимодействие с клетками [17] — такой материал будет отличаться от исходного.

Другим подходом является подтверждение химической природы выявляемых электронно-плотных включений такими методами аналитической электронной микроскопии как ЭДС или спектроскопия характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ). В тех случаях, когда элементный состав выявляемых наночастиц значительно отличается от состава биологических образцов (наночастицы металлов), метод ЭДС является оптимальным [18, 19]. Но для УНЧ данный метод неэффективен. Использование СХПЭЭ для биологических образцов лимитировано высокими требованиями к толщине срезов, а также затрудняет использование контрастирующих агентов [20]. Таким образом, именно дифракция

электронов является единственным инструментом аналитической электронной микроскопии, с помощью которого можно осуществлять идентификацию МУНТ на ультратонких срезах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявление наночастиц в биологических образцах и их последующая идентификация необходимы при изучении их воздействия на живые объекты. Известно, что УНЧ (в частности, МУНТ) способны оказывать на живые объекты не только прямое воздействие (путем попадания в клетки), но и опосредованное – через запуск продукции провоспалительных цитокинов [21]. При отсутствии адекватных методов идентификации УНЧ, использование только морфологического критерия для их поиска на ультратонких срезах может приводить к ложноположительным выводам о наличии наночастиц в образце. Что, в свою очередь, может полностью исказить интерпретацию полученных результатов. В данной работе нами показано, что первичный поиск УНЧ наиболее целесообразно проводить на частично контрастированных срезах, без использования цитрата свинца. Дифракция электронов в сочетании с морфологическим анализом наночастиц при помощи стандартной ТЭМ являются необходимым и достаточным набором методов для выявления и идентификации УНЧ на ультратонких срезах. Критерием идентификации УНЧ является совпадение электронограмм выявленных наночастиц с полученными ранее эталонными. На наш взгляд, применение данного подхода при исследовании взаимодействия УНЧ и живых организмов, может повысить релевантность получаемых данных.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания МГУ им. М.В. Ломоносова № 22-2-21 (рег. номер ЦИТИС 121032300098-5) “Механизмы выживания и гибели клеток” и Соглашения № 1/2022 о научном сотрудничестве между ЦНИИТ и МГУ им. М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simakov S.K. // Geosci. Front. 2018. V. 9. No. 6. P. 1849.
2. Notarianni M., Liu J., Vernon K. et al. // Beilstein J. Nanotechnol. 2016. V. 7. P. 149.
3. Bandlapalli C., SreeGaddam H.U., Chintmaneni P.K. et al. // Saudi J. Med. Pharm. Sci. 2021. V. 7. No. 8. P. 395.
4. Suzuki S., Mori S. // J. Air Waste Manag. Assoc. 2017. V. 67. No. 8. P. 873.
5. Losacco C., Perillo A. // Environ. Sci. Pollut. Res. 2018. V. 25. Art. No. 33901.
6. Strojny B., Kurantowicz N., Sawosz E. et al. // PLoS ONE. 2015. V. 10. No. 12. Art. No. e0144821.
7. Glaeser R.M., Gareth T. // Biophys. J. 1969. V. 9. No. 9. P. 1073.
8. Yuan X., Zhang X., Sun L. et al. // Part. Fibre Toxicol. 2019. V. 1. No. 16. P. 18.
9. Malatesta M. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 12789.
10. Mühlfeld C., Rothen-Rutishauser B., Vanhecke D. et al. // Part. Fibre Toxicol. 2007. V. 4. Art. No. 11.
11. Kurygina A.V., Erokhina M.V., Makarevich O.A. et al. // Biochem. 2018. V. 83. No. 3. P. 200.
12. Кирпичников М.П. Порядок выявления и идентификации агрегатов многостенных углеродных нанотрубок в срезах тканей животных и растений методами аналитической электронной микроскопии: Методические рекомендации МР 1.2.0045-11. М.: ФЦГиЭ Роспотребнадзора, 2012. с. 39.
13. Reynolds E.S. // J. Cell Biol. 1963. V. 1. No. 17. P. 208.
14. Sasaki H., Arai H., Kikuchi E. et al. // Sci. Reports. 2022. V. 12. No. 1. P. 7756.
15. Yildirim L., Thanh N.T.K., Loizidou M. et al. // Nano Today. 2011. V. 6. No. 6. P. 585.
16. Joshi A., Kaur S., Singh P. et al. // Appl. Nanosci. 2018. V. 6. No. 8. P. 1399.
17. Nagaraju K., Reddy R., Reddy N. // J. Appl. Biomater. Funct. Mater. 2015. V. 4. No. 13. Art. No. e301-12.
18. Coméra C., Cartier C., Gaultier E. et al. // Part. Fibre Toxicol. 2020. V. 1. No. 17. P. 26.
19. Shebanova A. S., Bogdanov A.G., Ismagulova T.T. et al. // Biophysics. 2014. V. 2. No. 59. P. 284.
20. Gass M., Porter A., Bendall J. et al. // Ultramicroscopy. 2009. No. 110. P. 946.
21. Snyder-Talkington B.N., Schwegler-Berry D., Castanova V. et al. // Part. Fibre Toxicol. 2013. V. 10. P. 35.

Carbon nanoparticle identification using transmission electron microscopy methods in biological samples

A. G. Masyutin^{a, b, *}, E. K. Tarasova^b, G. E. Onishchenko^a, M. V. Erokhina^{a, b}

^aDepartment of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

^bDepartment of Pathomorphology, Cell Biology and Biochemistry, Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, 107564 Russia

*e-mail: squiggoth@yandex.ru

Carbon nanoparticles are a common type of nanoparticles, the identification of which in biological samples is associated with great difficulties. It is demonstrated that the use of standard transmission electron microscopy in combination with the electron diffraction method is a reliable and relevant tool for the carbon nanoparticles identification in biological samples.