

ПОЛИМЕРНЫЕ, БИООРГАНИЧЕСКИЕ
И ГИБРИДНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 606

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР ДЛЯ ОЦЕНКИ РОЛИ
МЕХАНИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ОБРАЗОВАНИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК

© 2021 г. Л. Ю. Басырева^{1,*}, Е. А. Федорова^{1,2}, В. А. Полонский², И. В. Скопинцев⁴, А. Л. Лусс³,
А. А. Сиваев², С. А. Гусев¹, М. И. Штильман³, И. А. Грицкова²

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

² РТУ МИРЭА Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

⁴ Российский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

*E-mail: basyreva@mail.ru

Поступила в редакцию 06.10.2020 г.

После доработки 27.10.2020 г.

Принята к публикации 27.10.2020 г.

В настоящее время описано достаточно большое количество индукторов образования нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ). Особое значение имеют механические факторы (МФ), поскольку они постоянно действуют при прохождении нейтрофилов через систему микроциркуляции. Для адекватного выбора терапии при различных заболеваниях, сопровождающихся чрезмерным образованием НВЛ, необходимо оценивать способность нейтрофилов пациентов образовывать НВЛ в ответ на различные индукторы. Изучение роли МФ в активации нейтрофилов у пациентов представляет определенные трудности, связанные с внедрением в лабораторную практику дорогих и сложных систем регистрации. Возможной альтернативой существующих подходов к изучению МФ в активации нейтрофилов может быть применение совместной инкубации цельной крови с гемосовместимыми полимерными микросферами (ПМС). Для разработки такого подхода получены полистирольные микросферы, содержащие четвертичные аммониевые группы, на поверхности которых закреплены гемосовместимые агрегаты, состоящие из тиюоктадецил поли-N-винил-2-пирролидона (ПМС_{нано}). Полученные данные свидетельствуют о том, что при инкубации образцов крови с ПМС_{нано} в условиях мягкого перемешивания количество образовавшихся НВЛ статистически достоверно выше, чем в условиях стационарного режима инкубации. Это подтверждает представления о том, что МФ способны активировать нейтрофилы и запускать процесс образования НВЛ. Предложенный подход к оценке влияния МФ на процессы активации нейтрофилов благодаря простоте выполнения может найти широкое применение как в медико-биологических исследованиях, так и в практике клинических лабораторий.

DOI: 10.1134/S1992722321010027

ВВЕДЕНИЕ

В 2004 г. был открыт новый тип активации нейтрофилов, получивший название нетоз [1]. В результате нетоза нейтрофилы формируют во внеклеточном пространстве нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ), состоящие из сети, образованной нитями ДНК. В ячейках этой сети закреплены различные белки гранул нейтрофилов (эластаза, миелопероксидаза, дефензины и др.).

Формирование НВЛ является регулируемым процессом, хотя соответствующие сигналы не полностью поняты. Ключевые ферменты в формировании НВЛ: нейтрофильная эластаза, разру-

шающая внутриклеточные белки и запускающая процесс распада ядра; пептидиларгининдеиминаза четвертого типа, которая цитруллинизирует гистоны, обеспечивая деконденсацию и высвобождение хромосомной ДНК; и гасдермин Д, генерирующий поры в плазматической мембране нейтрофилов, тем самым способствуя ее разрыву и выходу ДНК и связанных с ней молекул во внеклеточное пространство [2–7].

Хотя НВЛ принимают участие в защите организма человека от патогенов, побочный ущерб от чрезмерного формирования НВЛ также стимулирует многие патологические процессы, например происходящие во время вирусных инфекций [8]. Действительно, чрезмерное образование НВЛ

может вызвать каскад воспалительных реакций, которые способствуют метастазированию раковых клеток, разрушают окружающие ткани, облегчают микротромбоз и приводят к необратимым повреждениям тканей легких, сердечно-сосудистой системы и почек [9, 10].

В настоящее время описано достаточно большое количество индукторов образования НВЛ, среди которых выделяют бактерии, грибы, вирусы, иммунные комплексы, липополисахариды, тромбоциты, форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) и др. [4].

Кроме того, в экспериментах было обнаружено, что механические факторы, возникающие в процессе прохождения нейтрофилов через каналы микрофлюидных чипов и при деформации поверхности клеток с помощью микропипетки, могут выступать индукторами активации [11, 12].

Похожие механические воздействия нейтрофилы претерпевают и в условиях организма, при прохождении через систему микроциркуляции [13, 14].

Для адекватного подбора терапии при различных заболеваниях, сопровождающихся чрезмерным образованием НВЛ, необходимо оценивать способность нейтрофилов пациентов образовывать НВЛ в ответ на различные индукторы. Если оценка действия различных молекулярных и клеточных индукторов является вполне реальной задачей, то изучение роли механических факторов в активации нейтрофилов у пациентов представляет определенные трудности, связанные с внедрением в лабораторную практику дорогих и сложных систем регистрации.

Возможной альтернативой существующих подходов к изучению механических факторов в активации нейтрофилов может быть использование гемосовместимых полимерных микросфер (ПМС), инкубированных с цельной кровью. При этом если инкубация цельной крови с гемосовместимыми ПМС будет происходить при перемешивании (качанием), то перемещающиеся друг относительно друга ПМС будут создавать механические факторы воздействия на нейтрофилы.

Одним из вариантов создания гемосовместимых полимерных микросфер может являться иммобилизация агрегатов модифицированного поливинилпирролидона на поверхность функциональных полистирольных микросфер [15].

В связи с этим цель настоящего исследования – разработать подходы к применению полимерных микросфер для оценки роли механических факторов в образовании нейтрофильных внеклеточных ловушек, которые в перспективе можно было бы применить в клинической практике.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вещества. Стирол (Ст), дивинилбензол (ДВБ), перекись бензоила (ПБ), триметиламин (ТМА), хлороводородная кислота и куркумин приобретены у фирмы “Sigma-Aldrich”, диоктилсульфосукцинат натрия (АОТ) – “ХимРеакт” и “Acros” (Geel, Бельгия), динитрил азобисизомасляной кислоты (ДАК) – “ЛДХим”, монохлордиметиловый эфир (МХДМЭ) – “Merck”, поливиниловый спирт (ПВС) – “Kuraray”, поливинилпирролидон (ПВП) – “КурскХимПром”. Этанол – продукт фирмы “СпиртМед”, N-винил-2-пирролидон, 1, 4-диоксан, n-октадецилмеркаптан – фирмы “Acros” (Geel, Бельгия)). Все химические вещества использовали без дополнительной очистки. Все растворители и компоненты буферных растворов были аналитического качества и использовались в том виде, в котором их получили.

Синтез микросфер проводили в четыре стадии:

- дисперсионная полимеризация стирола;
- многостадийная затравочная полимеризация;
- хлорметилирование;
- аминирование.

Дисперсионную полимеризацию стирола проводили в этаноле (этанол, 60 мл) в присутствии инициатора (ДАК, 0.6 г) и стабилизатора (ПВП, 3.0 г и АОТ, 2.0 г) при медленном механическом перемешивании при 50°C и одновременного добавления стирола (20 мл). Процесс вели 6.5 ч, постепенно увеличивая температуру до 70°C. Частицы выделяли центрифугированием, промывали этиловым спиртом и редиспергировали в водной среде. На этом этапе были получены монодисперсные ПМС диаметром ~2.5 мкм. Полученные частицы использовали в последующей затравочной полимеризации, состоящей из пяти стадий.

В первых четырех стадиях использовали полистирольные частицы (14 г), стирол (100 г), ПБ (1.5 г), первую и вторую водные фазы (150 и 350 мл). На этом этапе были получены ПМС диаметром 32 мкм. После каждой стадии полимеризации микросферы промывали водой на фильтре Шотта. На пятой стадии в мономерную фазу добавляли ДВБ (95 и 5 г) и ПВС (0.9 г). После окончания полимеризации частицы промывали водой на фильтре Шотта, экстрагировали ацетоном и дихлорметаном, просеивали на ситах с размером ячеек от 94 до 112 мкм и сушили. Конечный диаметр ПМС составил ~60 мкм.

Хлорметилирование проводили, добавляя в реактор предварительно высушенные полимерные частицы (100 г), МХДМЭ (300 мл) и катализатор хлорид олова(IV) (60 г). Процесс проводили в течение 6 ч при температуре 25°C. Полученную смесь промывали на фильтре Шотта этанолом

(2 раза) и ацетоном (2 раза). После удаления остатков катализатора частицы двукратно промывали этанолом и сушили при температуре 60°C, в результате на данном этапе были получены частицы диаметром 80 мкм.

Аминирование проводили при температуре 80°C, добавляя к хлорметилированному полимеру ГМА (40%-ный водный раствор, 200 мл), выдерживали 6 ч при перемешивании при температуре 40°C. Остатки ГМА удаляли промыванием водой на фильтре Шотта до нейтральной реакции воды. Частицы переводили в хлорированную форму, используя раствор соляной кислоты (10%, 400 мл).

Определение распределения ПМС по диаметрам. Для определения распределения ПМС по размерам использовали микроскоп Motic B3 (Motic Asisa, Hong Kong). Анализ размеров проводили с помощью программы ImageJ. Среднечисловой (D_n) и средневесовой (D_w) диаметры частиц и коэффициент полидисперсности (PDI) рассчитывали по формулам:

$$D_n = \frac{\sum N_i D_i}{\sum N_i},$$

$$D_w = \frac{\sum N_i D_i^2}{\sum N_i D_i},$$

$$PDI = D_w / D_n.$$

Тиооктадецил поли-N-винил-2-пирролидон (ПВП-ОД) синтезировали по методике, описанной в [16, 17]. ПВП-ОД растворяли в обеспыленной бидистиллированной воде (0.01 г/мл), полученный раствор перемешивали на шейкере в течение 4–6 ч, после этого отбирали и анализировали образцы.

Второй способ получения полимерных частиц состоял в ультразвуковом диспергировании (CV 33 Sonics Vabracel) смеси равных объемов растворов ПВП-ОД в воде (0.1 г/мл) и раствора куркумина в ацетоне (0.01 г/мл) при охлаждении. Затем полученный раствор центрифугировали в течение 25 мин при 5000 об./мин. Супернатант замораживали в жидком азоте и сушили лиофильно.

Для всех экспериментов лиофилизированный порошок частиц диспергировали в дистиллированной воде (0.02 мг/мл). Во всех случаях распределение частиц по размерам определяли методом анализа траекторий наночастиц (NTA – Nanoparticle Tracking Analysis), используя инструмент Nanosight LM10 (Malvern) и спектрометр динамического и статического рассеяния света Photocor Complex (Photocor). Полученные дисперсии частиц разбавляли дистиллированной водой при 25°C до концентрации 1 мг/мл,

Морфологию полимерных наночастиц изучали методом трансмиссионной электронной микроскопии с использованием микроскопа “JEOL

JEOL-2000” (Япония) при напряжении 20–30 кВ. Для приготовления образцов каплю суспензии частиц помещали на подложку из раствора поливинилформала (0.2 мас. %, Sigma (США)), нанесенного на медную сетку. После высушивания образец помещали в микроскоп и проводили исследование.

Для получения гемосовместимых ПМС смешивали суспензию полистирольных микросфер, на поверхности которых имеются четвертичные аммониевые группы (90% СО), с суспензией полимерных агрегатов ПВП-ОД (1 мкг/мл) в соотношении 1:1. Полученную смесь выдерживали при комнатной температуре 1 ч, после этого 3 раза промывали физиологическим раствором. Полученные таким образом ПМС_{нано}, использовали для инкубации с кровью.

Регистрация количества НВЛ. Венозную кровь забирали в вакутейнеры с цитратом натрия в качестве антикоагулянта. Затем 50 мкл крови добавляли к 100 мкл суспензии, содержащей ПМС_{нано}, и инкубировали 30 мин в термостате при 37°C в двух режимах: в стационарном и при мягком постоянном перемешивании в мешалке Biosan.

Из каждого образца, а также из крови сразу после ее взятия готовили стандартизированные мазки и окрашивали их по Романовскому. Количественную оценку НВЛ проводили в соответствии с предложенным в [18] методом, основанном на подсчете лейкоцитов и НВЛ в средней части мазков. Результат выражали как отношение НВЛ к общему числу лейкоцитов (%). Для подсчета клеток на мазках использовали световой микроскоп Motic B3 (Motic Asisa, Hong Kong).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ STATISTICA 6.0. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента и *U*-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных ПМС показал, что они имеют сферическую форму, гладкую поверхность. Диаметр ПМС в среднем составил 100 мкм (рис. 1). Средневесовой, среднечисловой диаметры частиц и коэффициент полидисперсности составляют соответственно $D_w = 106.8$, $D_n = 105.3$, $PDI = 1.01$, что свидетельствует об узком распределении по диаметрам.

Анализ полимерных ПВП-ОД частиц показал, что они имели средний гидродинамический диаметр 105 нм и ζ -потенциал, равный –2.81 мВ. Полимерные частицы ПВП-ОД, содержащие солюбилизованный куркумин, имели средний гидродинамический диаметр 73 нм и ζ -потенциал, равный –4.0 мВ.

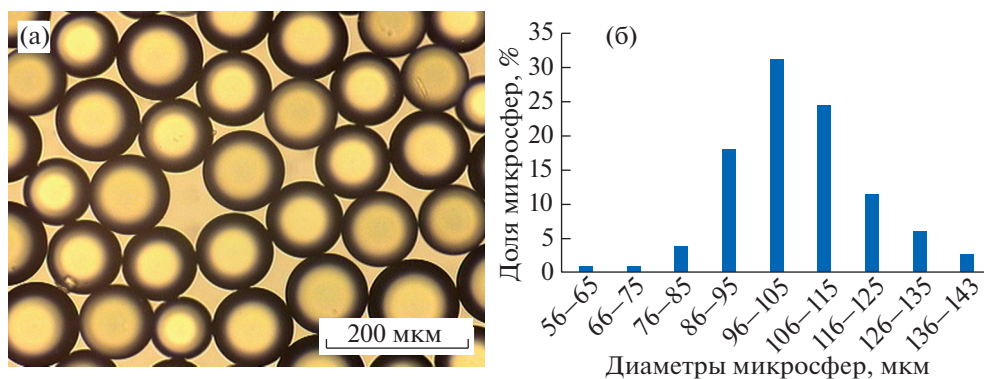


Рис. 1. Световая микроскопия (а) и распределение микросфер по диаметрам (б).

Результаты исследования полученных наночастиц с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) показали, что во всех случаях синтезированные частицы имели форму, близкую к сферической и сплошное электронно-плотное ядро. Наиболее типичная форма частиц представлена на рис. 2.

Схема взаимодействия полистирольных микросфер, содержащих четвертичные аммониевые группы на поверхности с агрегатами ПВП-ОД, содержащих солюбилизованный куркумин, приведена на рис. 3. Предполагается, что четвертичные аммониевые группы на поверхности полистирольных микросфер, создающие сильный положительный заряд, электростатически взаимодействуют с амидными группами ПВП-ОД 6000, образуя композиционные микросферы типа ядро-оболочка. Это предположение подтверждается наличием яркой флуоресценции в виде светящихся ободков толщиной несколько десятков микрон после трехкратного промывания физиологическим раствором (рис. 4).

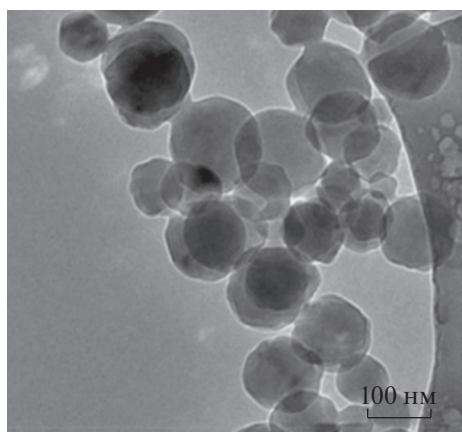


Рис. 2. ПЭМ-микрофотографии наночастиц ПВП-ОД-6000, нагруженных куркумином.

Полученные данные показывают, что наночастицы надежно прикрепляются к ПМС и не удаляются промыванием физиологическим раствором.

Принимая во внимание тот факт, что величины зарядов и диаметров наночастиц, наполненных куркумином, и наночастиц без куркумина близки, в дальнейших экспериментах для получения гемосовместимых композиционных ПМС использовали наночастицы без куркумина. Полученные таким образом ПМС_{нано} использовали в экспериментах с кровью доноров.

После смешивания ПМС_{нано} с кровью донора форменные элементы оказываются расположенными в промежутках между микросферами. При перемешивании композиционные частицы ПМС_{нано} начинают перемещаться в различных направлениях, создавая механические воздей-

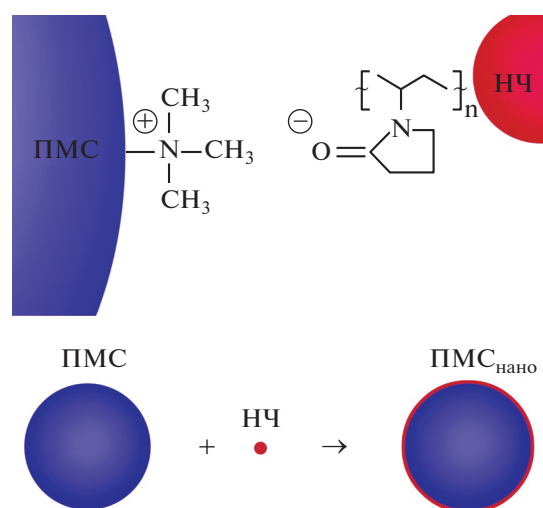


Рис. 3. Схема взаимодействия полимерных микросфер (ПМС) с наночастицами (НЧ), наполненными куркумином.

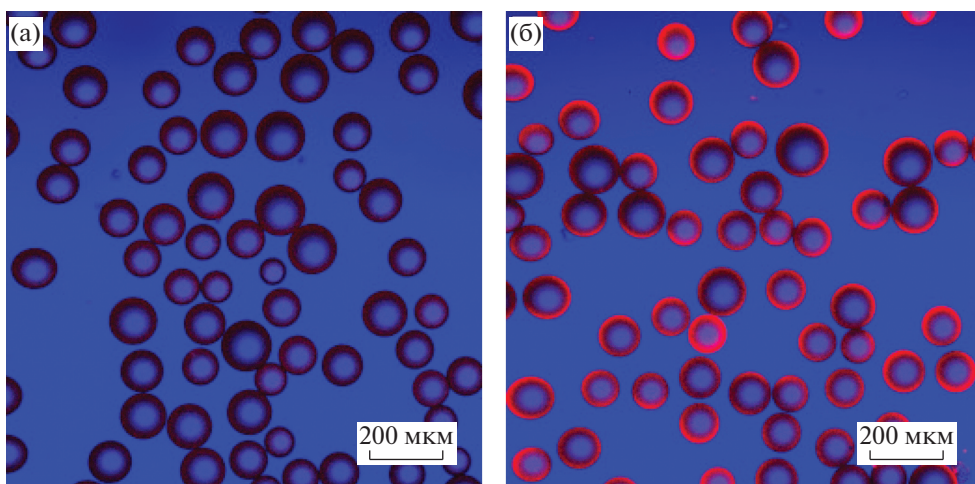


Рис. 4. Исходные ПМС (а) и полимерные микросферы после инкубации с наночастицами, наполненными куркумином (б).

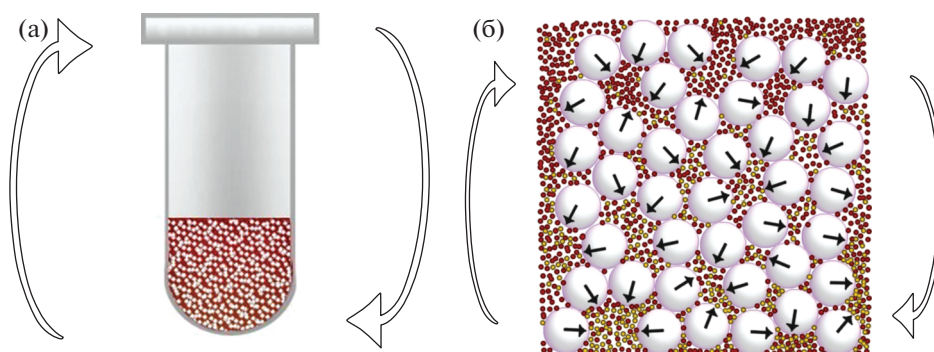


Рис. 5. Эппендорф с ПМС_{нано} и кровью (а); нейтрофилы и другие форменные элементы крови в пространстве между ПМС_{нано} (б). Стрелки (→) – возможное направление движения ПМС_{нано} при перемешивании.

ствия на все клетки крови, включая нейтрофилы (рис. 5).

Исследование мазков, полученных из образцов крови, инкубированных с ПМС_{нано} в стационарных условиях и при перемешивании, показало, что после инкубации морфологические характеристики эритроцитов по сравнению с контролем не меняются (рис. 6). Важно отметить, что инкубация не влияет на количество эритроцитов, имеющих форму сфероцитов и эхиноцитов, что косвенно говорит об отсутствии гемолиза.

В то же время анализ нейтрофилов на мазках показал, что после инкубации образцов крови с ПМС_{нано} в стационарных условиях их морфологические характеристики по сравнению с контрольными не меняются (рис. 7а, 7б), а в условиях перемешивания около 30% нейтрофилов выглядят деформированными. На поверхности нейтрофилов формируются отростки длиной 2–4 мкм и шириной около 5 мкм (рис. 7в).

Количественный анализ НВЛ, проведенный на мазках крови, показал, что после инкубации крови с ПМС_{нано} в стационарном режиме количество ловушек статистически по сравнению с контролем достоверно увеличивается (рис. 8). После инкубации в условиях перемешивания количество вновь образованных НВЛ статистически достоверно выше, чем при инкубации в стационарном режиме (рис. 8).

Увеличение НВЛ при инкубации в стационарном режиме свидетельствует о том, что в данных экспериментальных условиях гемосовместимость ПМС_{нано} в отношении нейтрофилов реализуется не полностью несмотря на то, что поверхность микросфер покрыта гемосовместимыми наночастицами. Вероятно, это связано с тем, что в процессе электростатического взаимодействия между функциональными группами ПМС и ПВП-ОД может оставаться свободная поверхность полистирольных микросфер, покрытая ам-

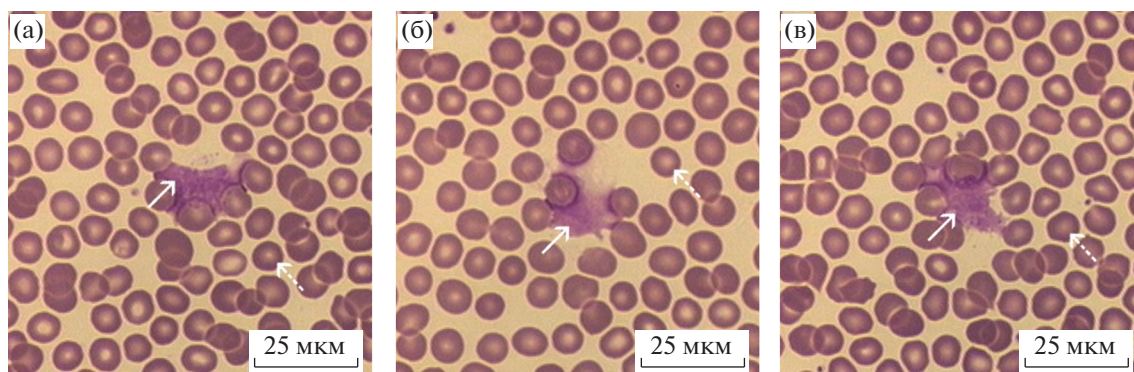


Рис. 6. Фото НВЛ (→) с эритроцитами (---) до (а) и после 30 мин инкубации при 37°C с ПМС_{нано} в стационарных условиях (б) и при перемешивании (в).

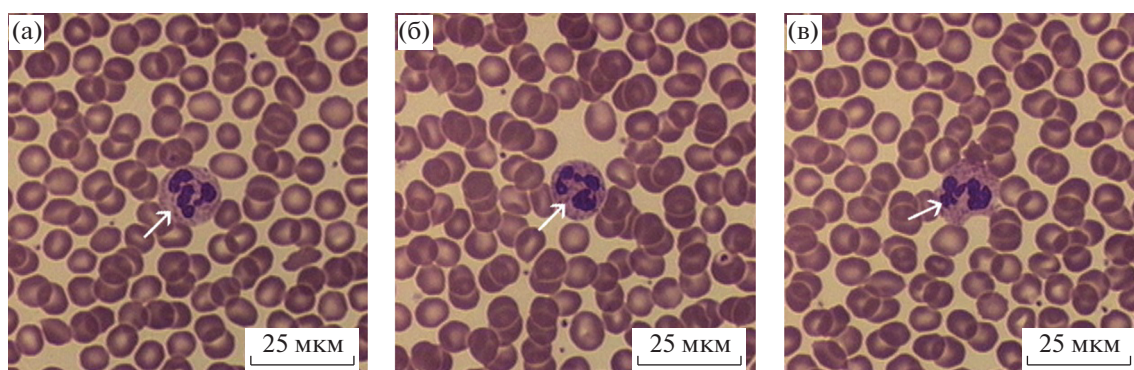


Рис. 7. Репрезентативные фото нейтрофилов (→): а – до инкубации (контроль), б – после 30 мин инкубации при 37°C с ПМС_{нано} в стационарных условиях, в – после 30 мин инкубации при 37°C с ПМС_{нано} в условиях перемешивания.

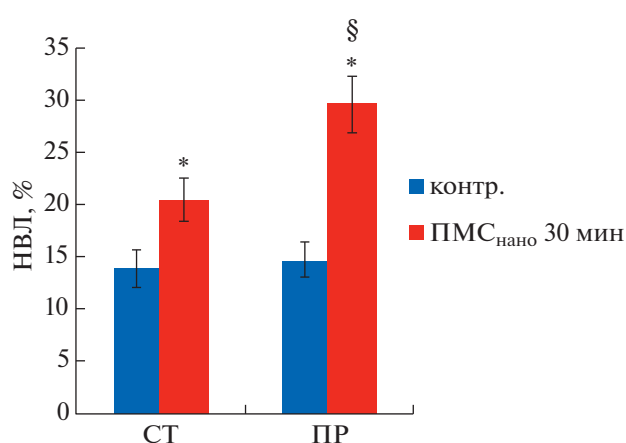


Рис. 8. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (%) по отношению к лейкоцитам через 30 мин после инкубации цельной крови с ПМС_{нано} в стационарных условиях (СТ) и при перемешивании (ПР); * – $P < 0.05$ – по сравнению с контролем; § – $P < 0.05$ – по сравнению с СТ.

мониевыми группами, на которой нейтрофилы могут активироваться.

Кроме того, в условиях настоящих экспериментов наночастицы были иммобилизованы на поверхность ПМС. Весьма вероятно, что при взаимодействии нейтрофилов с иммобилизованными наночастицами на поверхности ПМС их локальная концентрация может оказаться значительно выше, чем при определении гемосовместимости в крови *in vitro* без ПМС [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ динамики движения нейтрофилов в микроциркуляторном русле показывает, что они постоянно подвергаются механическому воздействию. Это происходит, во-первых, в тех местах микроциркуляторного русла, где нейтрофилы пытаются войти в капилляры, диаметр которых меньше, чем размеры нейтрофила, а движущиеся мимо эритроциты сталкиваются с нейтрофилами.

Во-вторых, часто в посткапиллярных венулах нейтрофилы медленно движутся вдоль стенки. При этом эритроциты очень быстро перемещаются током крови, задевая нейтрофилы. Подобные события могут приводить к активации нейтрофилов и образованию НВЛ.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при инкубации образцов крови с ПМС_{нано} В условиях перемешивания количество образовавшихся НВЛ статистически достоверно выше, чем в условиях стационарного режима инкубации. Это подтверждает представления о том, что механические факторы способны активировать нейтрофилы и запускать процесс образования НВЛ.

Отметим, что предложенный подход к оценке влияния механических факторов на процессы активации нейтрофилов благодаря простоте выполнения может найти широкое применение как в медико-биологических исследованиях, так и в практике клинических лабораторий. Можно предположить, что внедрение такого подхода к оценке роли механических факторов в активации нейтрофилов позволит обоснованно подойти к разработке терапии, направленной на нормализацию процессов образования НВЛ нейтрофилами в сосудистом русле, которая поможет предотвратить развитие различных осложнений при широком спектре заболеваний, связанных с воспалительными процессами.

Работа выполнена в рамках государственного задания по проекту FSSM-2020-0004 при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 13.1902.21.0011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. // Science. 2004. V. 303. № 5663. P. 1532. <https://doi.org/10.1126/science.1092385>*
2. *Chen K.W., Monteleone M., Boucher D. et al. // Sci. Immunol. 2018. V. 3. № 26. P. 11. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6676>*
3. *Kaplan M.J., Radic M. // J. Immunol. 2012. V. 189. № 6. P. 2689. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>*
4. *Papayannopoulos V. // Nat. Rev. Immunol. 2018. V. 18. P. 134. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.105>*
5. *Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. // J. Cell. Biol. 2010. V. 191. № 3. P. 677. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>*
6. *Rohrbach A.S., Slade D.J., Thompson P.R., Mowen K.A. // Front. Immunol. 2012. V. 3. P. 360. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00360>*
7. *Sollberger G., Choidas A., Burn G.L. et al. // Sci. Immunol. 2018. V. 3. № 26. 12 p. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aar6689>*
8. *Schönrich G., Raftery M.J. // Front. Immunol. 2016. V. 7 P. 366. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00366>*
9. *Jorch S.K., Kubes P. // Nat. Med. 2017. V. 23. P. 279. <https://doi.org/10.1038/nm.4294>*
10. *Kessenbrock K., Krumbholz M., Schönemmarck U. // Nat. Med. 2009. V. 15. P. 623. <https://doi.org/10.1038/nm.1959>*
11. *Yu X., Tan J., Diamond S.L. // J. Thromb. Haemost. 2018. V. 16. № 2. P. 316. <https://doi.org/10.1111/jth.13907>*
12. *Ekpenyong A.E., Toepfner N., Fiddler C. et al. // Sci. Adv. 2017 V. 3. P. 11. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602536>*
13. *Куприянов В.В., Караганов Я.Л., Козлов В.И. Микроциркуляторное русло. М.: Медицина, 1975. 216 с.*
14. *Чернух А.М., Александров П.Н., Алексеев О.В. Микроциркуляция. М.: Медицина, 1975. 456 с.*
15. *Tsatsakis A., Stratidakis A.K., Goryachaya A.V. et al. // Food. Chem. Toxicol. 2019. V. 127. P. 42. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.041>*
16. *Kulikov P.P., Kuskov A.N., Goryachaya A.V. et al. // Polymer Sci. D. 2017. V. 10. № 3. P. 264. <https://doi.org/10.1134/S199542121703008X>*
17. *Luss A.L., Kulikov P.P., Romme S.B. et al. // Nanomedicine. 2018. V. 13. № 7. P. 703. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0311>*
18. *Basyreva L.Y., Brodsky I.B., Gusev A.A. et al. // Hum. Antibodies. 2016. V. 24. № 3–4. P. 39. <https://doi.org/10.3233/HAB-160293>*