

ПОЛИМЕРНЫЕ, БИООРГАНИЧЕСКИЕ И ГИБРИДНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 606

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПОДХОДОВ К ОЦЕНКЕ КОЛИЧЕСТВА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК

© 2021 г. Е. В. Войнова^{1,*}, Л. Ю. Басырева¹, А. А. Сиваев², С. А. Гусев¹,
И. А. Грицкова², С. Н. Чвалун²

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

² МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, Россия

*E-mail: ek.vl.voinova@gmail.com

Поступила в редакцию 06.10.2020 г.

После доработки 27.10.2020 г.

Принята к публикации 27.10.2020 г.

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ) играют важную роль в антимикробной защите организма. Однако их чрезмерное образование приводит к развитию различных патологических процессов в организме. Поэтому количественная оценка содержания НВЛ в цельной крови человека очень важна в клинической практике. Предложен подход, позволяющий использовать полимерные микросферы (ПМС), поверхность которых модифицирована гепарином, в качестве сорбентов для выделения из цельной крови и количественного определения НВЛ. Для решения поставленной задачи синтезированы полистирольные микросферы со средним диаметром 140 мкм, содержащие аминогруппы, проведена ковалентная иммобилизация гепарина на их поверхность, продемонстрирована зависимость, близкая к линейной, между количеством НВЛ и количеством ДНК-гистоновых комплексов, связывающихся с поверхностью синтезированных ПМС. Полученные данные свидетельствуют о том, что предложенный подход может оказаться перспективным для применения как в фундаментальных исследованиях, так и в клинической практике.

DOI: 10.1134/S1992722321010106

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы, также известные как полиморфноядерные лейкоциты (ПМЛ), являются одними из самых распространенных лейкоцитов в организме человека. У взрослых приблизительно от 1×10^{11} до 2×10^{11} нейтрофилов генерируется в костном мозге каждый день. Они попадают в кровоток, где циркулируют в течение 4–10 ч, после чего элиминируются [1, 2].

Нейтрофилы являются первыми клетками, которые проникают в очаг повреждения, принимают участие в удалении из очага микроорганизмов и поврежденных клеток. Немаловажную роль нейтрофилы играют в процессе заживления ран в зоне повреждения. Понимание роли нейтрофилов в процессах, реализующихся в очаге повреждения, базируется на анализе механизмов, регулирующих процессы активации нейтрофилов.

В 2004 г. группа доктора А. Зычлинского обнаружила, что нейтрофилы могут убивать патогены вне клеток, выбрасывая сетеподобные структуры, которые они назвали нейтрофильными внеклеточными ловушками (НВЛ) [3]. Процесс образо-

вания НВЛ был назван нетозом. Основными компонентами НВЛ являются ДНК, гистоны, антимикробные пептиды и ферменты, такие как эластаза и миелопероксидаза. Процесс образования НВЛ начинается с активации нейтрофила под действием различных индукторов, например бактерий, грибов, простейших или вирусов. При этом изменяется структура ядра и цитоплазматических гранул клетки. После стимуляции хроматин ядра нейтрофилов подвергается деконденсации. Этот процесс происходит под действием ферментов, таких как нейтрофильная эластаза (НЭ) и миелопероксидаза (МПО). Впоследствии мембрана ядра повреждается, распадаясь на множество мелких пузырьков, и деконденсированный хроматин попадает в цитоплазму. Далее гранулы нейтрофила растворяются, и внутриклеточные компоненты распределяются по всему объему цитоплазмы [4–6].

Предполагается, что НВЛ связывают микроорганизмы благодаря электростатическим взаимодействиям между отрицательно заряженными

фибриллами хроматина и положительно заряженной бактериальной поверхностью [7].

Однако формирование НВЛ может играть не только положительную, но и отрицательную роль в организме. Чрезмерное образование НВЛ в кровотоке или нарушение клиренса НВЛ может приводить к образованию тромбов, вызывать ишемию и являться причиной развития полиорганной недостаточности [8, 9]. Показано, что чрезмерное образование НВЛ играет существенную роль в развитии осложнений при атеросклерозе, муковисцидозе, диабете, системной красной волчанке, пародонтите, сепсисе, тромбозе и т.д. В настоящее время известно большое количество методов, которые используются для количественного определения НВЛ в крови [10–15]. Однако ни один из них не нашел широкого применения в клинической практике. В связи с этим цель настоящего исследования — разработать подходы к применению функциональных полистирольных микросфер (ПМС) диаметром 140 мкм для количественного определения НВЛ в крови, которые в перспективе можно было бы применить в клинической практике.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вещества. Стирол (Ст), дивинилбензол (ДВБ), перекись бензоила (ПБ), триметиламин (ТМА), хлороводородная кислота, форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА) производства фирмы “Sigma-Aldrich”, диоктилсульфосукцинат натрия (АОТ) — “ХимРеакт” и “Acros” (Geel, Бельгия), динитрил азобисизомасляной кислоты (ДАК) — “ЛДХим”, монохлордиметилэфир (МХДМЭ) — “Merck”, поливиниловый спирт (ПВС) — “Kuraray”, этанол — “СпиртМед”. Все химические вещества марки ХЧ, их использовали без дополнительной очистки. Все растворители и компоненты буферных растворов были аналитического качества и использовались без дополнительной очистки.

Синтез ПМС со средним диаметром частиц 140 мкм. 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 одновременном добавлении стирола (20 мл). Процесс проводили 6.5 ч, постепенно увеличивая температуру до 70°C. Частицы выделяли центрифугированием, промывали этиловым спиртом и редиспергировали в водной среде. В результате были получены монодисперсные ПМС диаметром 2.5 мкм, которые использовали в последующей затравочной полимеризации, состоящей из шести стадий.

В первых пяти стадиях использовали полистирольные частицы (14 г), стирол (100 г), ПБ (1.5 г), водную фазу (500 мл). После каждой стадии поли-

меризации микросферы промывали водой на фильтре Шотта. На шестой стадии в мономерную фазу добавляли ДВБ (95 г) и ПВС (0.9 г). После окончания полимеризации частицы промывали водой на фильтре Шотта, экстрагировали ацетоном и дихлорметаном, просеивали на ситах и сушили.

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.

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

Полимерную суспензию подвергали очистке от непрореагировавших компонентов реакционной системы путем обработки суспензии ультразвуком в течение 3 мин при 60 у.е. (условная единица) на ультразвуковом диспергаторе Sonic Dismembrator Model 300 фирмы “Fisher” (Германия) с последующей заменой супернатанта после осаждения полимерных частиц. Полистирольные микросферы ресуспендировали в чистой дистиллированной воде. Цикл очистки повторяли 3 раза.

Все дальнейшие опыты с микросферами проводили после обработки их ультразвуком.

Распределения ПМС по размерам определяли методом микроскопии (микроскоп Motic В3 (Motic Asisa, Hong Kong), а анализ размеров проводили с помощью программы ImageJ. Среднечисловой (D_n) и средневесовой (D_w) диаметры частиц и коэффициент полидисперсности (PDI) рассчитывали по формулам:

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

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

$$PDI = D_w / D_n.$$

Для подтверждения наличия функциональных групп в ПМС использовали реакцию Майяра с глюкозой, которую проводили при температуре 60°C в течение 5 ч [16]. Для этого глюкозу растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS), суспен-

зию ПМС трехкратно промывали дистиллированной водой, раствор глюкозы (30%) и 4%-ную суспензию ПМС смешивали в соотношении 1:2.

Ковалентная иммобилизация гепарина на поверхность ПМС. Суспензию полистирольных микросфер со средним диаметром 140 мкм и концентрацией полимера 10% смешивали с водным раствором карбодиимида (10 мг/мл) в соотношении 10:1 и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании на ротаторе Multi Bio RS-24 фирмы BIOSAN. Полученную суспензию отмывали от карбодиимида раствором Хенкса 3 раза и добавляли раствор гепарина с концентрацией 5000 МЕ/мл. Инкубировали в течение 1.5 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании на ротаторе. Далее отмывали гепарин раствором Хенкса 3 раза, полученные ПМС_{геп} хранили при 4°C для дальнейшего использования.

Определение гепарина, иммобилизованного на поверхность ПМС, проводили по методике, предложенной в [17].

Для этого готовили 0.005%-ный раствор красителя толуидинового голубого и смешивали его с 4%-ной суспензией ПМС в соотношении 1:1. Добавляли равный объем *n*-гексана и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

Оценку наличия гепарина проводили по конечной окраске ПМС: фиолетовая окраска свидетельствует об отсутствии гепарина на поверхности, голубая – о его наличии.

В качестве контроля использовали исходные ПМС и полимерные микросферы с адсорбированным гепарином.

Регистрация количества НВЛ. Венозную кровь забирали в вакутейнеры с цитратом натрия в качестве антикоагулянта. Затем 50 мкл крови добавляли к 100 мкл суспензии ПМС 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. Для подсчета клеток на мазках и в камере Горяева использовали световой микроскоп Motic B3 (Motic Asisa, Hong Kong). На основе полученных данных рассчитывали количество НВЛ в 1 мкл.

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

Методика определения количества ДНК, сорбированного на ПМС_{ген}. 10 мкл крови смешивали с 50 мкл ПМС_{ген} и инкубировали в течение 2 ч при 40°C. После этого ПМС_{ген} трижды промывали PBS и фиксировали 0.5%-ным раствором параформальдегида в течение 30 мин. Окрашивали ДНК на ПМС_{ген} раствором этидиум бромид (50 мкг/мл) в течение 20 мин при комнатной температуре. Окрашенные ПМС_{ген} трижды промывали дистиллированной водой, флуоресценцию регистрировали с помощью конфокального микроскопа Nikon Eclipse E800 (Япония). Анализ интенсивности флуоресценции проводили с помощью программы ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтезированные ПМС имели круглую форму и сравнительно ровную поверхность (рис. 1а), средний диаметр 137 мкм и узкое распределение по размерам (PDI = 1.08) (рис. 1б).

Для подтверждения наличия реакционно способных функциональных групп на поверхности ПМС была проведена реакция Майяра между аминогруппами ПМС и глюкозой. Продукты этой реакции имеют коричневый цвет. На рис. 2 представлены фотографии полимерных суспензий до и после проведения реакции Майяра. Хорошо видно, что до проведения реакции Майяра ПМС имеют белый цвет, а после проведения реакции цвет ПМС становится коричневым. Эти данные указывают на то, что на поверхности ПМС имеются реакционноспособные аминогруппы, которые можно использовать для ковалентной иммобилизации биополимеров.

В качестве биополимера для специфического связывания НВЛ из цельной крови был выбран гепарин. Выбор основан на исследованиях, в которых было показано, что гепарин способен связываться с гистонами [19]. Тот факт, что гистоны входят в состав НВЛ, позволил предположить, что ПМС_{геп} будут связывать НВЛ в цельной крови.

Ковалентную иммобилизацию гепарина на поверхность аминосодержащих ПМС проводили с помощью карбодиимида. Для подтверждения наличия ковалентно иммобилизованного гепарина на поверхности ПМС использовали качественную реакцию с толуидиновым голубым. На рис. 3 представлены фотографии ПМС до ковалентной иммобилизации гепарина, после иммобилизации гепарина карбодиимидным методом и после адсорбции гепарина. На фото видно, что синяя окраска ПМС, свидетельствующая о наличии гепарина на поверхности, наблюдается только у ПМС_{геп}, в то время как образцы ПМС до ковалентной иммобилизации и ПМС после адсорбции гепарина были фиолетового цвета.

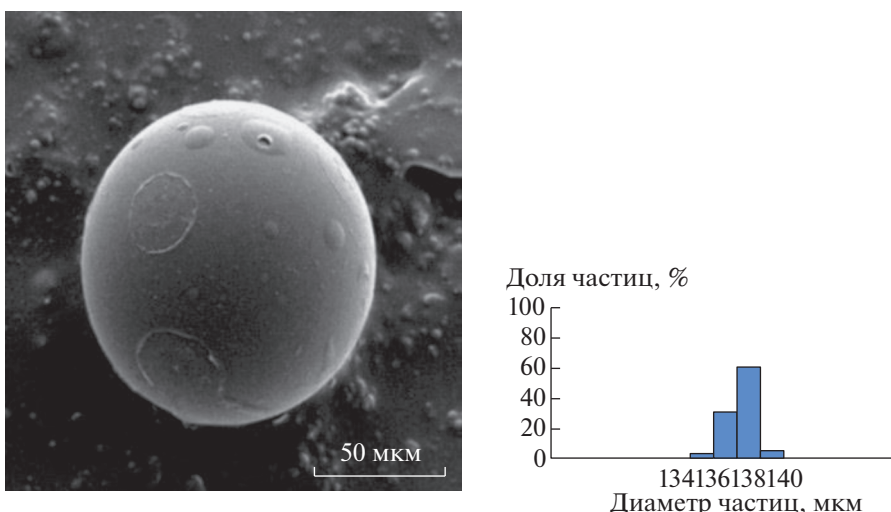


Рис. 1. Электронная микрофотография и гистограмма распределения ПМС с аминогруппами на поверхности по размерам.

Полученные данные свидетельствуют о том, что на поверхности ПМС_{геп} присутствует только ковалентно иммобилизованный гепарин.

Полученные ПМС_{геп} инкубировали с цельной кровью, отмывали от компонентов крови 3 раза физиологическим раствором и окрашивали этидиум бромидом. На рис. 4 представлены фотографии ПМС_{геп} и ПМС_{геп} после инкубации с цельной кровью. На рисунке видно, что после инкубации на поверхности ПМС_{геп} появляется ободок яркой флуоресценции шириной несколько десятков микрон.

Анализ профилей интенсивности флуоресценции ПМС_{геп}, выделенных на рис. 4в, 4г, показывает, что интенсивность флуоресценции в краевой зоне ПМС_{геп} до инкубации с цельной кровью (рис. 4д) составляет 75 у.е., что приблизительно в

3 раза меньше, чем интенсивность флуоресценции ПМС_{геп} после инкубации с цельной кровью (рис. 4е), которая равна 225 у.е. Полученные данные свидетельствуют о том, что на поверхности ПМС_{геп} после инкубации с цельной кровью закрепляются гистонсодержащие нити ДНК. Отметим, что в цельной крови помимо НВЛ могут присутствовать другие гистонсодержащие фрагменты ДНК, в том числе образованные при деградации НВЛ. Учитывая сказанное выше, необходимо было оценить соотношение между количеством НВЛ и интенсивностью флуоресценции ПМС_{геп} после инкубации с кровью.

Для этого из цельной крови донора были приготовлены четыре образца с различным содержанием НВЛ. Первый образец представлял собой плазму крови. Второй образец представлял собой кровь, которая была разведена плазмой в соотно-

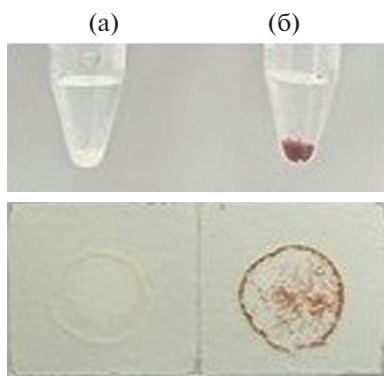


Рис. 2. Фотографии суспензий ПМС и результатов тонкослойной хроматографии исходных ПМС, содержащих поверхностные аминогруппы (а), и ПМС после проведения реакции Майяра (б).

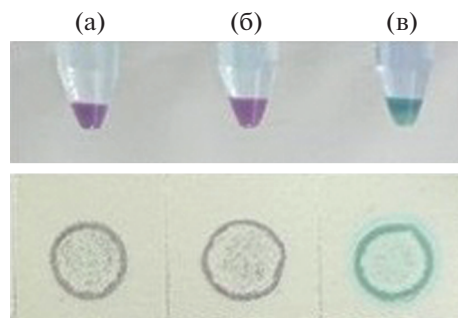


Рис. 3. Фотографии суспензий ПМС и результатов тонкослойной хроматографии после окрашивания толуидиновым голубым исходных ПМС, содержащих поверхностные аминогруппы (а), ПМС с адсорбированным гепарином (б) и ПМС с ковалентно иммобилизованным гепарином (в).

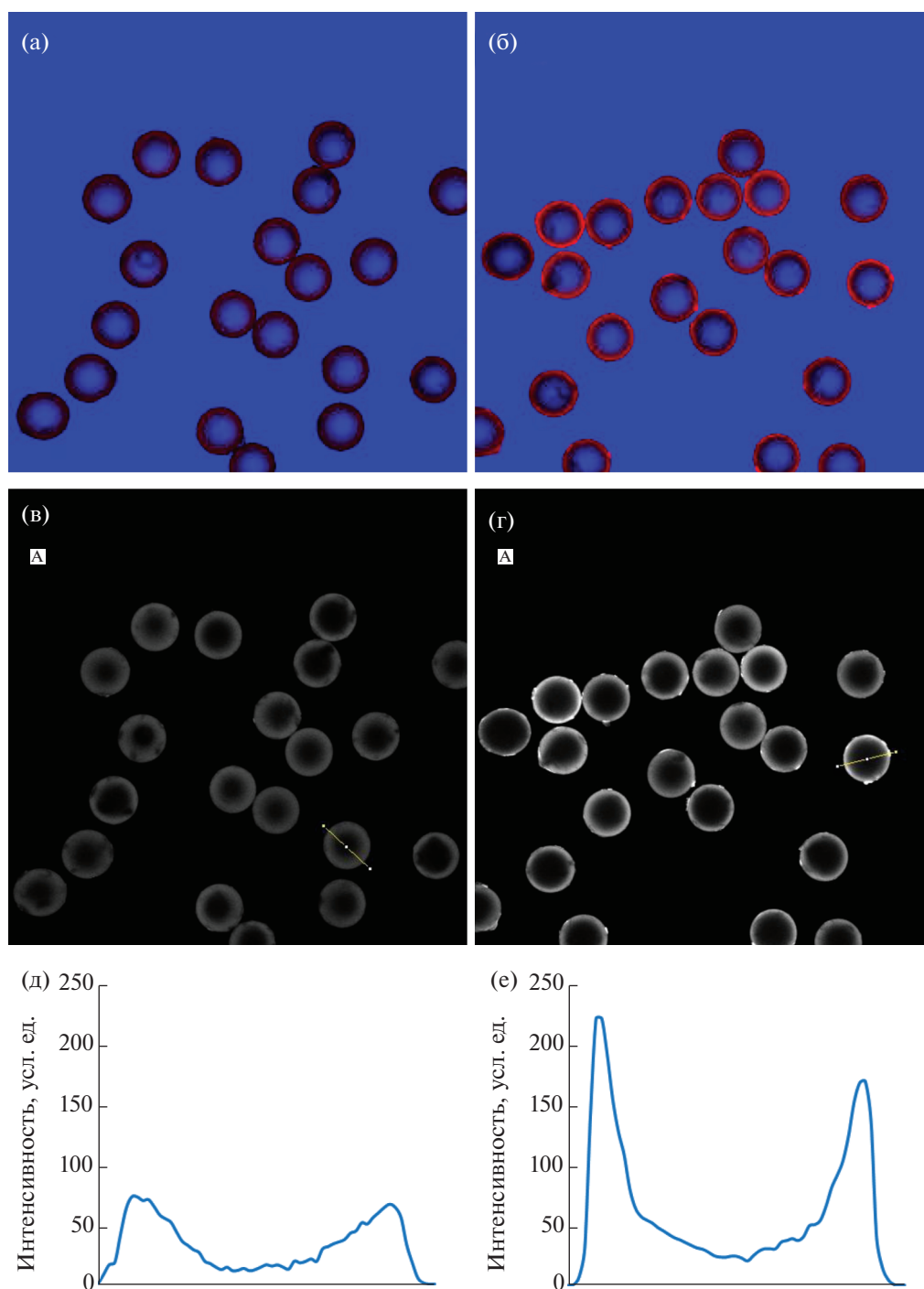


Рис. 4. Флуоресценция $PMC_{теп}$ (а, в, д) и флуоресценция $PMC_{теп}$ после взаимодействия с кровью (б, г, д).

шении 1:1. Третий образец – цельная кровь, которая была использована в нативной форме. Четвертый образец – кровь после двухчасовой инкубации со стимулятором образования НВЛ – ФМА.

Таким образом, были получены три образца крови донора, которые различаются по количеству НВЛ, и плазма донора, в которой ловушки должны отсутствовать.

На рис. 5 представлены результаты определения количества НВЛ в четырех приготовленных

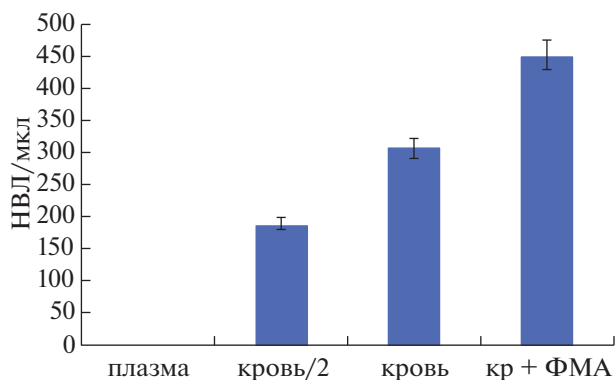


Рис. 5. Концентрация нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ/мкл), определенная традиционным методом анализа мазков, в образцах плазмы крови (плазма), крови, разведенной плазмой в соотношении 1:1 (кровь/2), цельной крови (кровь) и крови после инкубации со 100 нМ ФМА (кр + ФМА).

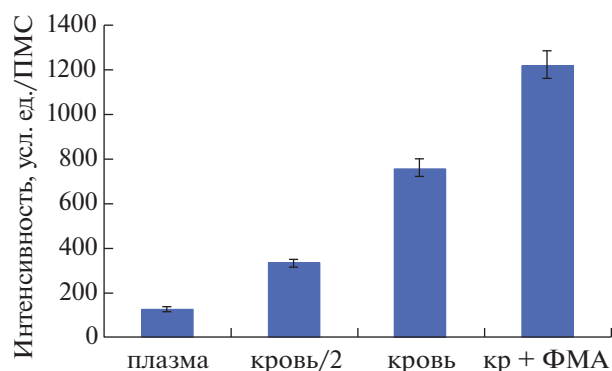


Рис. 6. Интенсивность флуоресценции ПМС_{геп} после их инкубации с образцами плазмы крови (плазма), крови, разведенной плазмой в соотношении 1:1 (кровь/2), цельной крови (кровь) и крови, после инкубации с 100 нМ ФМА (кр + ФМА).

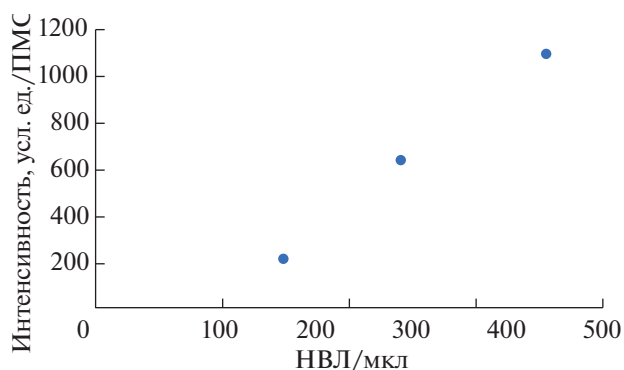


Рис. 7. Зависимость интенсивности флуоресценции ПМС от количества НВЛ в образцах крови.

образцах, рассчитанные на основании анализа мазков крови.

Действительно, в плазме крови НВЛ обнаружить не удалось. В образце крови, разведенной собственной плазмой в соотношении 1:1, количество НВЛ составило 188 НВЛ/мкл, в цельной крови количество НВЛ – 306 НВЛ/мкл, а в крови после инкубации со стимулятором образования НВЛ их количество составило 451 НВЛ/мкл.

Параллельно с анализом мазков крови была измерена флуоресценция ПМС_{геп} после инкубации со всеми четырьмя приготовленными образцами.

Анализ результатов показал, что средняя интенсивность флуоресценции, выраженная в у.е., в пересчете на 1 ПМС_{геп} – для плазмы составила 20 у.е., для образца крови, разведенного плазмой в соотношении 1:1, – 380 у.е., для цельной крови – 750 у.е. и для образца крови, инкубированного с ФМА, – 1200 у.е. (рис. 6).

На рис. 7 видно, что по мере увеличения количества НВЛ в образце возрастает интенсивность флуоресценции ПМС_{геп}.

Однако следует принимать во внимание тот факт, что интенсивность флуоресценции ПМС_{геп} в исследованных образцах может быть обусловлена различными ДНК-гистоновыми комплексами. На рис. 8 представлена схема, иллюстрирующая образование различных ДНК-гистоновых комплексов в крови. В результате запуска внутрисосудистого нетоза в крови образуются НВЛ, которые со временем под действием ДНКазы-1 расщепляются на небольшие растворимые фрагменты, состоящие из ДНК-гистоновых комплексов. Таким образом, в цельной крови находятся как НВЛ, так и их растворимые фрагменты. Инкубация плазмы крови с ПМС_{геп} должна приводить к связыванию растворимых фрагментов НВЛ. Поэтому интенсивность флуоресценции ПМС_{геп} после взаимодействия с плазмой крови донора обусловлена только наличием растворимых фрагментов НВЛ. Интенсивность флуоресценции ПМС_{геп} после инкубации с образцами крови, разведенной собственной плазмой в соотношении 1:1, и цельной кровью будет обусловлена как НВЛ, так и их растворимыми фрагментами. В образце крови, полученном после инкубации со 100 нМ ФМА, в нейтрофилах активируется нетоз, в результате которого увеличивается образование НВЛ. Кроме того, у части нейтрофилов запускается процесс аутофагии, в результате которого нейтрофилы разрушаются и внутриклеточные компоненты нейтрофилов, в том числе фрагменты хроматина, оказываются в плазме крови. Это приводит к тому, что интенсивность флуоресценции ПМС_{геп} после инкубации с этим образцом крови будет определяться наличием НВЛ, при-

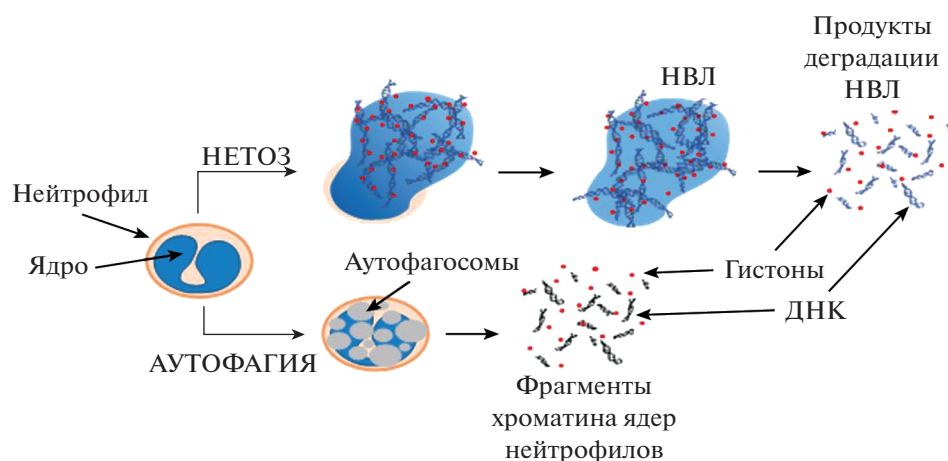


Рис. 8. Схема образования различных ДНК-гистоновых комплексов.

сутствием растворимых фрагментов НВЛ и фрагментов хроматина ядра нейтрофилов, подвергшихся автофагии. Дальнейшие исследования, проведенные на крови доноров и пациентов с различными заболеваниями, должны установить точные количественные соотношения между количеством НВЛ и интенсивностью флуоресценции ПМС_{ген}.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования показали, что полистирольные микросферы со средним диаметром 140 мкм и ковалентно иммобилизованным на их поверхности гепарином могут быть использованы в качестве сорбента для выделения и анализа гистон-содержащих ДНК-структур (нейтрофильных внеклеточных ловушек, фрагментов деградации НВЛ и фрагментов хроматина ядра нейтрофилов, подвергшихся автофагии). Продемонстрировано наличие зависимости, близкой к линейной, между количеством НВЛ, содержащихся в цельной крови, и интенсивностью флуоресценции ПМС_{ген}.

Благодаря простоте выполнения предложенный подход может оказаться перспективным при разработке методов количественного анализа НВЛ в цельной крови как в фундаментальных исследованиях, так и в клинике.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 13.1902.21.0011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meijer M., Przemyslaw M., Arazna M., Demkaw U. // *Centr. Eur. J. Immunol.* 2012. V. 37. № 4. P. 321.
2. Коротина О.Л., Генералов И.И. // *Имунопатология, аллергология, инфектология.* 2012. № 3. С. 23.
3. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. // *Science.* 2004. № 303. P. 1532.
4. Neeli I., Khan S.N., Radic M. // *J. Immunology.* 2008. № 180. P. 1895.
5. Gupta A.K., Hasler P., Holzgreve W. et al. // *Hum. Immunol.* 2005. V. 66. № 1. P. 146.
6. Zawrotniak M., Rapala-Kozjik M. // *Acta Biochim. Pol.* 2013. 60 № (3). P. 277.
7. Brinkmann V. // *J. Innate Immunol.* 2018. V. 10. № 5–6. P. 414.
8. Воробьева Н.В., Пунегин Б.В. // *Биохимия.* 2014. Т. 79. № 12. С. 1580.
9. Nel J.G., Theron A.J., Pool R., Durandt Ch. // *South African J. Sci.* 2016. P. 1.
10. Cohen J., Vincent J., Adhikari N. et al. // *Lancet Infect Dis.* 2015. № 15. P. 581.
11. Yu X., Tan J., Diamond S. L. // *J. Thromb Haemost.* 2018. V. 16. № 2. P. 316.
12. Demers M., Wagner D.D. // *OncoImmunology.* 2013. V. 2. № 2. P. e22946.
13. Pruchniak M., Arazna M., Demkow U. // *Centr. Eur. J. Immunol.* 2014. V. 39. № 1. P. 116.
14. Yu Y., Su K. // *J. Clin. Cell. Immunol.* 2013. V. 13. P. 1.
15. Beinikova I.V., Nurgaliyeva A.S., Demidchik L.A., Hendrikson V. // *Вестн. АГИУВ.* 2016. № 3. P. 29.
16. Dang Q., Li Ch.-G., Jin X.-X. et al. // *Carbohydrate Polymers.* 2019. № 205. P. 89.
17. Gritskova I.A., Sivaev A.A., Gusev S.A. et al. // *Russian Chemical Bulletin.* 2019. V. 68. № 11. P. 2075.
18. Basyreva L.Y., Brodsky I.B., Gusev A.A. et al. // *Hum. Antibodies.* 2016. V. 24. № 3–4. P. 39.
19. Longstaff C., Hogwood J., Grayl E. et al. // *Thrombosis and Haemostasis.* 2016. V. 115 (3). P. 591.