

ВЛИЯНИЕ ГРАФЕНОВЫХ НАНОПЛАСТИНОК, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ДНК, НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ pH НЕЙТРОФИЛОВ

М. С. Язлыев

yazlyyew909@gmail.com;

Научный руководитель — Е. И. Коваленко, кандидат биологических наук, доцент

В работе с применением флуоресцентного зонда 2',7'-бис(2-карбоксиитил)-5(6)-карбоксиифлуоресцеина тетраакис-(ацетоксиметилового) эфира изучено изменение pH цитоплазмы нейтрофилов при воздействии графеновых нанопластинок, нековалентно связанных с ДНК. Установлено, что в результате длительного воздействия на нейтрофилы графеновых частиц в высокой концентрации происходит закисление цитозоля нейтрофилов и повреждение клеток.

Ключевые слова: флуоресцентный анализ; графеновые нанопластинки; нейтрофилы; внутриклеточный pH; дезоксирибонуклеиновая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Материалы на основе графена имеют множество перспективных применений. Графен биосовместим и может быть использован в медико-биологических технологиях как компонент биосенсоров, имплантатов, носителей лекарственных веществ, матриц для выращивания культур клеток [1, 2]. Для повышения диспергируемости в водных средах графеновые частицы подвергают ковалентной или нековалентной модификации. Было показано, что графеновые нанопластинки, нековалентно связанные с полианионными молекулами ДНК (ГНП-ДНК), проявляют невысокую токсичность, но в больших концентрациях могут вызывать изменения свойств клеток крови [3]. Функцией иммунных клеток крови нейтрофилов является устранение из организма чужеродных частиц путем их захвата в ходе фагоцитоза или нетоза и разрушения по кислород-независимым механизмам или опосредовано через усиление генерации активных форм кислорода, хлора и азота ферментами НАДФН-оксидазой, миелопероксидазой (МПО), NO-синтазой. Показано, что активация ферментов нейтрофилов, наблюдаемая при проявлении функциональной активности этих клеток, ассоциирована с изменением внутриклеточных значений pH [4]. При патологиях и нарушении клеточного функционирования может происходить повреждение систем, отвечающих за регуляцию pH внутриклеточной среды. В данной работе поставлена цель изучить влияние ГНП-ДНК на pH цитоплазмы нейтрофилов при длительном воздействии в высоких концентрациях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы графеновые нанопластинки (ГНП): чешуйки с толщиной до 100 нм, имеющие размер в латеральном направлении от 500 нм до 50 мкм. Для получения ГНП-ДНК частицы ГНП помещали в раствор денатурированной ДНК и озвучивали 30 мин при частоте ультразвука 44 кГц. Нейтрофилы изолировали из крови доноров градиентным центрифугированием с применением гистобака (плотность 1077 кг/м³) и суспензировали в буферной среде Эрла при pH 7,35. В образцы клеток вносили ГНП-ДНК в различных концентрациях и инкубировали в течение 1–3 ч при 37 °С. Контрольные образцы содержали ДНК без ГНП. Затем в образцы добавляли флуоресцентный зонд 2',7'-бис(2-карбоксит-этил)-5(6)-карбокситфлуоресцеина тетраакис (ацетоксиметилловый) эфир (VCECF-AM, $pK_a = 7$) и инкубировали 30 мин. Далее клетки переводили в свежую среду Эрла и в полученных образцах с помощью флуориметра SM2203 («СОЛАР», РБ) регистрировали интенсивность флуоресценции на длине волны 531 нм при возбуждении на длинах волн 440 нм (I^{440} , изобестическая точка) и 503 нм (I^{503} , растет с ростом pH). Значения pH рассчитывали по формуле, приведенной в [5]:

$$pH = pK_a - \lg \left[\frac{\left(I^{503} / I^{440} - I_{\text{кисл}}^{503} / I_{\text{кисл}}^{440} \right) \cdot I_{\text{кисл}}^{440}}{\left(I_{\text{щел}}^{503} / I_{\text{щел}}^{440} - I^{503} / I^{440} \right) \cdot I_{\text{щел}}^{440}} \right]$$

Для калибровки клетки, загруженные VCECF-AM, разрушали и выполняли титрование с использованием HCl и NaOH, определяя предельные значения параметров в сильно кислой среде с HCl ($I_{\text{кисл}}^{440}$, $I_{\text{кисл}}^{503}$) и сильно щелочной среде с NaOH ($I_{\text{щел}}^{440}$, $I_{\text{щел}}^{503}$).

Статистический анализ полученных данных выполняли в программе Excel. Рассчитывались средние значения и доверительные интервалы (вероятность 95 %).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Обнаружено, что в результате инкубирования нейтрофилов в присутствии ГНП-ДНК в течение длительного времени (1–3 часа) происходит снижение значений pH в цитоплазме клеток по сравнению с контролем, не содержащем ГНП. На рис. 1 приведены данные, характеризующие уменьшение pH при увеличении концентрации ГНП, усредненные для нейтрофилов различных доноров. Статистически достоверные отличия pH наблюдаются при концентрациях ГНП-ДНК 90 и 180 мкг/мл, но не 30 мкг/мл (рис. 1). Ранее было выявлено, что ГНП-

ДНК в высоких концентрациях (десятки и сотни мкг/мл) приводит к начальной гиперстимуляции нейтрофилов, после которой происходит подавление активности клеток. Полученные в настоящей работе данные могут свидетельствовать о повреждении клеток и нарушении регуляции pH .

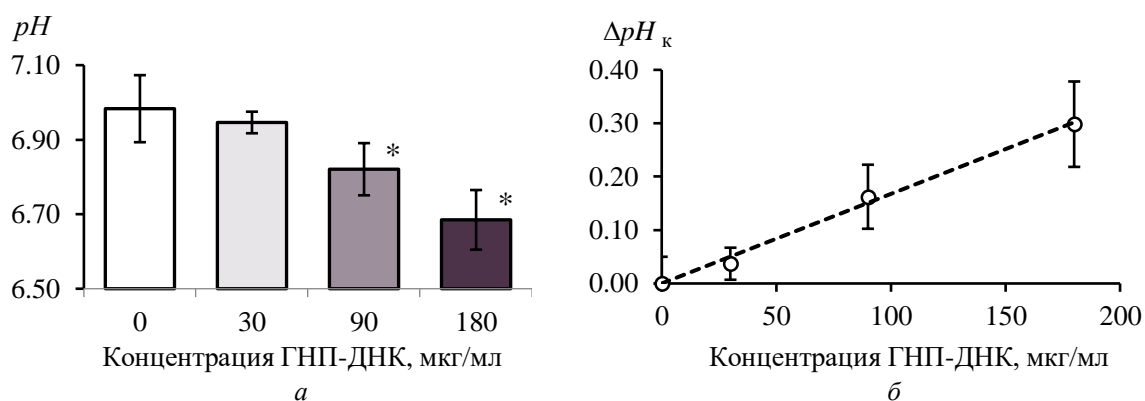


Рис. 1. Значения pH в цитозоле нейтрофилов, инкубированных в течение 2 ч в присутствии ГНП-ДНК в различных концентрациях:
a – уровень pH в цитозоле; *б* – отклонение значений цитоплазматического pH в образцах от контрольных значений

Для того, чтобы оценить сохранили ли нейтрофилы способность к функциональному отклику после длительного воздействия ГНП-ДНК, нами изучена реакция клеток на стимулятор формил-метионил-лейцил-фенилаланин (фМЛФ). Этот агент является аналогом пептида бактерий и может вызывать хемотаксис нейтрофилов, дегрануляцию, генерацию супероксида НАДФН-оксидазой, причем время реакции – всего несколько минут. На рис. 2 и 3 показано фМЛФ-индуцированное изменение значений pH в цитоплазме нейтрофилов (время измерения – 10 мин). Из рис. 2 видно, что клетки реагируют на фМЛФ, и при этом наблюдается первоначальное повышение pH в цитозоле всех образцов нейтрофилов – контрольных и подвергнутых предварительному воздействию ГНП-ДНК.

Повышение pH при стимулирующем действии фМЛФ может быть связано с активацией НАДФН-оксидазы [4], и, как следует из рис. 2, проявляется тем сильнее, чем больше было содержание ГНП-ДНК в суспензии нейтрофилов (кривые 3, 4). Как видно из рис. 2, на более поздних этапах скорость повышения значений pH во всех образцах уменьшается, что может быть следствием работы МПО, генерирующей кислоту НОС1 [4]. На рис. 3 приведены значения pH в цитоплазме нейтрофилов спустя 10 мин после внесения фМЛФ. Установлено, что после развития отклика клеток на фМЛФ цитоплазматические значения pH снижены в нейтрофилах, подвергавшихся воздействию ГНП-ДНК 90–180 мкг/мл.

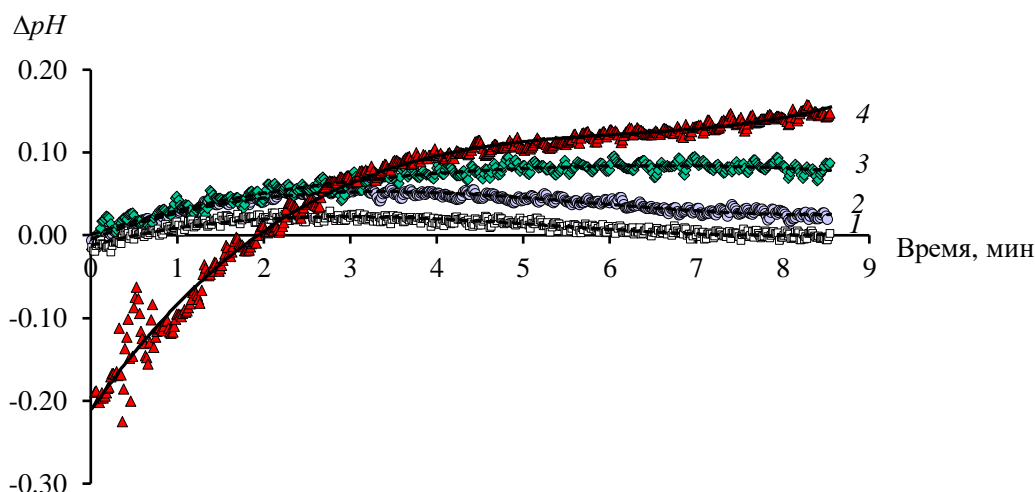


Рис. 2. Кинетические зависимости изменения pH в цитоплазме нейтрофилов, стимулированных фМЛФ, для клеток, подвергнутых воздействию ГНП-ДНК в концентрации (мкг/мл):

1 – 0 (контроль); 2 – 30; 3 – 90; 4 – 180; параметр ΔpH рассчитан по отношению к исходному уровню pH (до момента внесения фМЛФ в суспензию клеток)

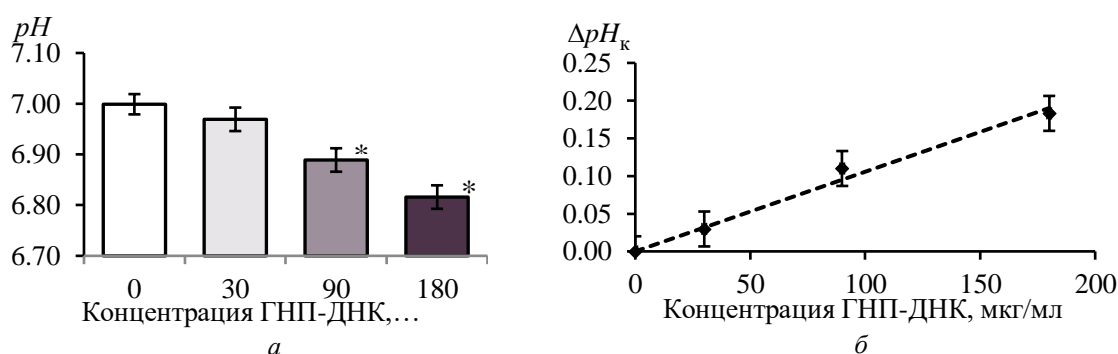


Рис. 3. Значения pH в цитозоле нейтрофилов спустя 10 мин после внесения фМЛФ в суспензии клеток, подвергнутых длительному инкубированию в присутствии ГНП-ДНК; в различных концентрациях:

a – уровень pH в цитозоле; b – отклонение значений цитоплазматического pH в образцах от контрольных значений

Таким образом, в результате длительного воздействия на нейтрофилы ГНП-ДНК в высоких концентрациях выявляются нарушения работы систем регуляции pH в клетках, происходит закисление цитоплазмы, что может быть следствием усиления продукции кислот (например, МПО) и может обуславливать механизмы повреждения и гибели клеток.

Библиографические ссылки

1. Singh S., et al. Graphene nanomaterials: the wondering material from synthesis to applications // Sensors Int. 2022. V. 3. P. 100190.

2. *Yusaf T., et al.* A comprehensive review on graphene nanoparticles: preparation, properties, and applications // *Sustainability*. 2022. V. 14. P. 12336.
3. *Соболевская Е. М., Коваленко Е. И., Кулагова Т. А.* Изменение активности нейтрофилов под действием углеродных наночастиц, функционализированных ДНК // Сб. тез. VII Всерос. конф. молодых ученых «VolgaMedScience», Н. Новгород : НГУ, 2021. С. 113–115.
4. *Foote J. R.* Imaging the neutrophil phagosome and cytoplasm using a ratiometric pH indicator // *J. Vis. Exp.* 2017. V. 122. P. 55107.
5. *Lanz E., Slavik J., Kotyk A.* 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein as a dual-emission fluorescent indicator of intracellular pH suitable for argon laser confocal microscopy // *Folia Microbiol.* 1999. V. 44 (4). P. 429–434.