“ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ”
“EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY”
Науково-практичний журнал/Scientific-practical journal

Наукові статті / Research article
ECPB 2018, 1(81): 68–73. <https://doi.org/10.1007/s00021-018-0000-0>

УДК 606:61+576+616-08

Шляхи активації нейтрофільних гранулоцитів за дії природних гідрофобних нанокристалів

С.Я. ПАРИЖАК, Т.І. ДУМИЧ, Р.О. БІЛИЙ

Danylo Halytskyi Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

E-mail: r.bilyy@gmail.com

Природні нанокристали (урати натрію, оксалати кальцію тощо) та антропогенні забруднювачі (нанодіаманти) нанорозмірного діапазону здатні взаємодіяти з плазматичною мембраною клітин організму. Нанодіаманти виникають за згорання мікрометеорів в атмосфері, при обробці матеріалів (полірування, шліфування), при друці на лазерних принтерах, у сажі та багатьох інших побутових відходах. Вони постійно контактують з тканинами організму у працівників певних професій, наприклад, при шліфуванні металів, добуванні вугілля тощо. Стратегія нашого організму в боротьбі з гідрофобними речовинами базується на їх окисненні, кон'югації з більш розчиненими гідрофільними аддуктами та видаленні. Однак, якщо інертний гідрофобний матеріал витримує окиснення, то він уникає регулярних механізмів очищення. Нанокристалічні плівки діамантів є кандидатами для модифікації поверхні імплантів при інтеграції останніх у кістку [8]. Нанокompозити є перспективними при керованому збільшенні проникності плазматичної мембрани для доставки ліків, генів чи флуоресцентних зондів [7, 12, 13]. Крім цього, нанокристали використовують для детекції клітинної загибелі [3]. Дані *in silico* [1] продемонстрували, що розміри наночастинок впливають на взаємодію з біологічними мембранами. Тканини людського організму створили механізми, щоб упоратися із впливом наночастинок, не викликаючи патологічних реакцій. Фагоцитоз, екскреція, ізоляція та іммобілізація – стратегії, які використовує наше тіло для взаємодії з гетерогенними наночастинами, та усунення їх [9].

У відповідь на екзогенні (бактерії, гриби та дрібний нанорозмірний пил), а також ендогенні стимули у вигляді часточок (кристали уратів та оксалатів) гранулоцити утворюють позаклітинні нейтрофільні пастки [5]. Процес складається зі швидкого вивільнення хроматину [15], залежить від активних форм кисню та містить RIPK-3 і MLKL некроптічного шляху [11], а також мієлопероксидази і еластази нейтрофілів [2]. Вивільнені ДНК та гістони володіють протимікробними і протизапальними факторами [5, 4, 16]. Агреговані нейтрофільні позаклітинні пастки сприяють зменшенню запального процесу, зв'язують та руйнують прозапальні медіатори [14]. На сьогодні немає доказів наявності специфічного рецептор-опосередкованого поглинання нанокристалів нейтрофілами. Проте через високу гідрофобність нанокристали взаємодіють безпосередньо з ліпідним бішаром плазматичної мембрани. Саме тому **метою роботи** було дослідження взаємодії нанокристалів із плазматичною мембраною різних типів клітин, зокрема імунокомпетентних, та визначення їхнього впливу на розвиток імунної відповіді.

Матеріали й методи дослідження. У ході виконання роботи використовували клітини лінії Jurkat (лінія лейкозних Т-лімфоцитів людини) та HeLa (рак шийки матки людини), які вирощували у середовищі RPMI

(Sigma-Aldrich, США) з додаванням декомплементованої сироватки крові великої рогатої худоби. Клітини вирощували у зволоженій атмосфері при $+37^{\circ}\text{C}$ та 5 % CO_2 та пасажували кожні два-три дні.

Для дослідження флуоресценції використовували флуоресцентний мікроскоп Olympus BX51 (Olympus GmbH, Німеччина), обладнаний системою диференційного інтерференційного контрасту.

Експериментальних тварин (мишей лінії Balb/C) було поділено на п'ять груп (у кожній $n = 7$) та проведено імунізацію на 1-й та 15-й день експерименту. При цьому внутрішньочеревно вводили овальбумін (Sigma-Aldrich, США) за наявності або відсутності ад'юванту. Тест на визначення гіперчутливості сповільненого типу проводили через 28 днів після 1-ї імунізації шляхом ін'єкції овальбуміну у подушечку правої задньої лапки. Для контролю використовували введення фізіологічного розчину у подушечку лівої задньої лапки. Розміри лапки вимірювали перед і через 48 год після ін'єкції.

Усі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до рішення біоетичної комісії (протокол №6 від 24/06/2013) та згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Для визначення вмісту антитіл проводили імуноферментний аналіз [6]. Антиген насорбовували на імунологічні планшети. Відмивали забуферним фізіологічним розчином (ЗФР) із додаванням 0,5% Tween-20 (ЗФР-Т). Додавали сироватку у розведенні 1:1 000, інкубували 1 год та відмивали. Мічені пероксидазою хрому антитіла проти мишачих імуноглобулінів G (IgG) додавали у розведенні 1:20 000 та інкубували 1 год. Планшети відмивали та вносили субстрат ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин). Реакцію зупиняли 10% сірчаною кислотою та вимірювали поглинання при 450 нм, використовуючи мікропланшетний аналізатор PE HTS 7000.

Результати представлені як середнє значення $\pm$ середнє квадратичне відхилення щонайменше трьох незалежних експериментів. Статистичний аналіз даних проводили із використанням критерію Ст'юдента для визначення достовірної різниці досліджуваних параметрів на програмному забезпеченні Microsoft Excel та GraphPad Prism 5.03. Значення $P < 0,05$ вважалися статистично значущими.

Результати дослідження та їх обговорення. Нанодіаманти внаслідок високої гідрофобності безпосередньо взаємодіють із ліпідним компонентом клітинних мембран. Тому ми провели мікроскопічні дослідження для визначення впливу нанодіамантів різного розміру на плазматичну мембрану клітин. Додавання нанодіамантів розміром 10 нм, d10, до адгерентних клітин лінії HeLa призводило до вираженого цитотоксичного впливу асоційованого із вакуолізацією. Проте нанодіаманти, розмір яких понад 50 нм, не взаємодіяли з біологічними мембранами (рис. 1).

Безпосереднє додавання нанодіамантів розміром 10 нм до клітин HeLa призводило до появи внутрішньоклітинних мембран у місцях взаємодії плазматичної мембрани з нанодіамантами, а також переміщення ДНК у ці мембранні везикули (не показано). Додавання нанодіамантів різного розміру до суспензійних клітин лінії Jurkat спричиняло утворення так званих розеток (рис. 2). При цьому наночастинки розміром 10 нм взаємодіяли із мембранами клітин, внаслідок чого утворювались агрегати.

Таким чином, нанодіаманти пошкоджують плазматичну мембрану різних типів клітин. Епітеліальні клітини слугують біологічним бар'єром, і така взаємодія може бути важливою у нанотерапевтичних системах доставки речовин.

Обчислювальне мембранне моделювання дає змогу встановити зв'язок між розмірами частинок, силою адгезії та спонтанною кривиною бішару плазматичної мембрани. Розраховані два критичні розміри частинок, які визначають силу взаємодії з ліпідами мембран, а саме: 10 нм для сильної

адгезії та 1000 нм для слабкої адгезії [1]. Отримані нами дані ще раз підтверджують ці математичні розрахунки.

Рис. 1. Результати аналізу взаємодії нанокристалів із поверхнею клітин лінії HeLa з використанням диференційно-інтерференційного контрасту (верхній рядок), світлової (середній рядок) та флуоресцентної мікроскопії (нижній рядок, збудження 546 нм, емісія 570–630 нм). Інкубування клітин із нанодіамантами (10 мкг/мл) протягом 4 год

Рис. 2. Взаємодія нанодіамантів різного розміру з клітинами лінії Jurkat.
Додавання d10 призводить до формування так званих розеток

Для дослідження впливу нанодіамантів на організм, а саме здатності викликати імунну відповідь, проведена імунізація тварин овальбуміном з використанням частинок різних розмірів: 10 нм – d_{10} , 10 нм вкритих поліетиленгліколем – $d_{10\text{ПЕГ}}$ і 1000 нм – d_{1000} . Як позитивний контроль використовували ад'ювант Фрейнда (повний на 1-й день та неповний на 15-й день імунізації). Клітинну імунну відповідь оцінювали на 28-й день від початку експерименту. Вимірювання товщини лапки дало змогу оцінити реакцію гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) порівняно з овальбуміном. Уведення d_{10} разом із овальбуміном призводило до зростання реакції ГСТ (рис. 3, а). Проте d_{1000} та $d_{10\text{ПЕГ}}$ показали значно нижчу ад'ювантну активність у розвитку клітинної імунної відповіді. Пегелювання d_{10} ($d_{10\text{ПЕГ}}$) призводило до значного зниження імуностимулюючого потенціалу d_{10} . При пегелюванні знижується гідрофобність частинок, що і пояснює дані, отримані у ході виконання роботи.

Для оцінки гуморальної імунної відповіді було визначено вміст імуноглобуліну класу G проти овальбуміну (анти-ОВА IgG). Найвищий титр антитіл проти овальбуміну спостерігався при використанні частинок d_{10} як ад'юванту та майже відповідав значенням, отриманим із ад'ювантом Фрейнда. Проте d_{1000} і гідрофільні $d_{10\text{ПЕГ}}$ були менш ефективними (рис. 3, б). Отримані дані різниці між досліджуваними групами є статистично достовірними, оскільки у всіх випадках $P < 0,05$.

Рис. 3. Розвиток імунної відповіді *in vivo* залежно від розміру нанодіамантів: а – оцінка реакції гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ); б – визначення вмісту антитіл проти овальбуміну (анти-ОВА IgG) при використанні частинок різного розміру. Ад'ювант Фрейнда (АФ) – позитивний контроль; введення овальбуміну без ад'юванту (б/а) – негативний контроль. О.Г. – оптична густина

Отже, тривалі запальні реакції та пошкодження тканин були спричинені невеликими за розмірами частинками (саме d_{10}), які діяли як ад'юванти специфічних гуморальних та клітинних імунних реакцій.

Описано, що гідрофобність наночастинок золота безпосередньо пов'язана з рівнем стимуляції спленцитів *in vitro*. Проте такого ж рівня асоціації після внутрішньовенного введення даних частинок мишам не виявлено [10], тому шлях уведення наночастинок є основним у визначенні результатів імунної відповіді.

Таким чином, з'ясовано механізм взаємодії природних нанокристалів (на прикладі гідрофобних алотропних модифікацій вуглецю – нанодіамантів) із поверхнею клітин, а саме: взаємодія плазматичної мембрани з гідрофобними нанодіамантами, розмір яких співмірний із товщиною ліпідного бішару мембрани (~10 нм), спричиняє гідрофобні взаємодії ліпідів із поверхнею нанодіамантів. У випадку нейтрофільних гранулоцитів дія нанодіамантів індукуватиме активацію утворення позаклітинних нейтрофільних пасток, а у випадку інших ядерних клітин – спричинятиме загибель клітин внаслідок втрати цілісності клітини. Під час загибелі клітини через канали (інвагінації ліпідного бішару), утворені включеннями нанодіамантів, буде здійснюватися витік низькомолекулярних компонентів у позаклітинне середовище. Під час ендоцитозу пошкоджена мембрана зливається з первинними лізосомами, викликаючи витік лізосомального вмісту, що у свою чергу викликає каскад подій, пов'язаних із продукцією реактивних форм кисню та екстерналізацією хроматину (рис. 4).

Рис. 4. Схематичне зображення взаємодії плазматичної мембрани із гідрофобними нанодіамантами, розмір яких співмірний із товщиною ліпідного бішару мембрани (~10 нм)

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

Подяка: «Гранту Президента для підтримки наукових досліджень молодих учених» Ф70, грант МОЗ України 0116U000759.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Agudo-Canalejo J, Lipowsky R. Critical particle sizes for the engulfment of nanoparticles by membranes and vesicles with bilayer asymmetry. *ACS Nano*. 2015;9(4):3704-20.
2. Akong-Moore K, Chow OA, von Köckritz-Blickwede M, Nizet V. Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. *PLoS One*. 2012;7(8):e42984.
3. Bilyy R, Podhorodecki A, Nyk M, Stoika R, Zaichenko A, Zatoryb G, et al. Utilization of GaN:Eu³⁺ nanocrystals for the detection of programmed cell death. *Phys E Low-dimensional Syst Nanostructures*. 2008;40(6):2096-9.
4. Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, et al. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med*. 1998;4(5):615-8.
5. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
6. Fickentscher C, Magorivska I, Janko C, Biermann M, Bilyy R, Nalli C, et al. The pathogenicity of anti-82GP1-IgG autoantibodies depends on Fc glycosylation. *J Immunol Res*. 2015;2015:1-12.
7. Grama S, Boiko N, Bilyy R, Klyuchivska O, Antonyuk V, Stoika R, et al. Novel fluorescent poly(glycidyl methacrylate) – Silica microspheres. *Eur Polym J*. 2014;56:92-104.
8. Grausova L, Bacakova L, Kromka A, Potocky S, Vanecek M, Nesladek M, et al. Nanodiamond as promising material for bone tissue engineering. *J Nanosci Nanotechnol*. 2009;9(6):3524-34.
9. Huizar I, Malur A, Midgette YA, Kukoly C, Chen P, Ke PC, et al. Novel murine model of chronic granulomatous lung inflammation elicited by carbon nanotubes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(4):858-66.
10. Moyano DF, Goldsmith M, Solfiell DJ, Landesman-Milo D, Miranda OR, Peer D, et al. Nanoparticle hydrophobicity dictates immune response. *J Am Chem Soc*. 2012;134(9):3965-7.
11. Mulay SR, Desai J, Kumar S V, Eberhard JN, Thomasova D, Romoli S, et al. Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis. *Nat Commun*. 2016;7:10274.
12. Prylutska S, Bilyy R, Shkandina T, Bychko A, Cherepanov V, Andreichenko K, et al. Effect of iron-doped multi-walled carbon nanotubes on lipid model and cellular plasma membranes. *Mater Sci Eng C*. 2012;32(6):1486-9.
13. Prylutska S, Bilyy R, Shkandina T, Rotko D, Bychko A, Cherepanov V, et al. Comparative study of membranotropic action of single- and multi-walled carbon nanotubes. *J Biosci Bioeng*. 2013;115(6):674-9.
14. Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhöfer D, Frey B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat Med*. 2014;20(5):511-7.
15. Schorn C, Janko C, Latzko M, Chaurio R, Schett G, Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front Immunol*. 2012;3:277.
16. Tkalcovic J, Novelli M, Phylactides M, Iredale JP, Segal AW, Roes J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity*. 2000;12(2):201-10.

RESEARCH ARTICLES

Pathways of neutrophil activation by natural hydrophobic nanocrystals

S. PARYZHAK, T. DUMYCH, R. BILYY

Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine

E-mail: r.bilyy@gmail.com

Natural nanocrystals (sodium urates, calcium oxalates, etc.) or anthropogenic pollutants (nanodiamonds, NDs) of the nanosized range can interact with a plasma membrane (PM) of body cells. The strategy of our organism in the fight against hydrophobic substances is based on their oxidation, conjugation with more dissolved hydrophilic adducts and their subsequent removal. Nanocomposites are promising agents for controlled enhanced permeability of the PM for the delivery of drugs, genes, or fluorescent probes. In addition, nanocrystals are used to detect cell death. Recent data *in silico* demonstrated the critical effect of nanoparticles size on their ability to interact with PM.

In response to exogenous (bacteria, fungi and tiny nanosized dust), as well as endogenous stimuli in the form of particles (urate crystals and oxalates) granulocyte form the neutrophil extracellular traps (NETs). The process consists of rapid release of chromatin and depends on the active forms of oxygen. Discharged DNA and histones possess antimicrobial and anti-inflammatory factors. Aggregated NETs help to reduce inflammatory response, bind and destroy proinflammatory mediators. Now there is no evidence of the presence of specific receptor-mediated absorption of nanocrystals by neutrophils. However, due to high hydrophobicity, nanocrystals interact directly with the lipid bilayer of the PM. That is why the aim of this study was to investigate the interaction of nanocrystals with a PM of different cell types, particularly immunocompetent, and to determine their effect on development of the immune response.

HeLa and Jurkat cell lines were cultured in RPMI media supplemented with fetal calf serum and 5% CO₂ at 37°C.

Balb/C mice were used for experiments. Ovalbumin was injected intraperitoneally in the presence or absence of adjuvants at day 1 and day 15 of the experiment. The delayed-type hypersensitivity (DTH) test was carried out 28 d after the first immunization by injection of OVA into the right hind paw. It swelling was assessed by the thickness of the foot 48 h after the injection.

For determination of anti-OVA IgG enzyme-linked immunosorbent assay was used. All serum samples were diluted 1:1 000 and incubated at 37 °C. Goat Anti-Mouse IgG-HRP was diluted in washing buffer 1:20 000 and incubated at room temperature. The assay was conducted with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate. The reaction was stopped by means of sulfuric acid. The absorbance was read at 450 nm.

The interaction of small NDs with adherent epithelial cells (HeLa) leads to cytotoxicity associated with vacuolization. The same results were observed after adding nanocrystals to the nonadherent cells (Jurkat). Only small NDs (10 nm) induced the damage of PM.

For the analysis of immune response, we used d₁₀, d_{10PEG}, and d₁₀₀₀ nanocrystals as adjuvants in an ovalbumin immunization model. The cellular immune response against ovalbumin was evaluated as DTH reaction. The d1000 and small d10 NDs after PEGylation (d10PEG) showed significantly lower cellular adjuvant activity. It is known that the PEGylation procedure decreases hydrophobicity and only marginally influences the size of the diamonds.

It was shown that the size of nanoparticles plays a crucial role in interaction with lipid bilayer, leading to PM damage. NDs trigger granulocyte activation and NETs formation. In the case of other nuclear cells, the interaction with NDs cause cell death due to loss of membrane integrity. Based on the data of cell interaction with NDs, we proposed this mechanism. The hydrophobic particles of the sizes comparable to the thickness of lipid bilayers (10 nm) penetrate through PM and disturb its barrier function by forming channels around the particles, causing cell swelling and simultaneously activating membrane regeneration by means of endosomes.

The data obtained are of vital importance for understanding of the physiology and biochemical pathways involved in the diseases related to exposure to hydrophobic nanoparticles, like lung disease of workers polishing diamond and mining coal, etc.

Key words: plasma membrane, inflammation, nanocrystals, immune response.