

© Мартынова Е.А., Баранов В.И., 2014
УКД 577.152:612+577.354.26:612

Мартынова Е.А., Баранов В.И.

Активация перитонеальных нейтрофилов мышей при введении наночастиц карбида вольфрама *in vivo*

ГБОУ дополнительного профессионального образования Российская медицинская академия постдипломного образования, 123995, Москва, ул. Баррикадная, 2/1

Два образца наночастиц карбида вольфрама диаметром 15 и 50 нм, а также наночастицы карбида вольфрама с включением 8% кобальта ($d = 50$ нм) вводились внутривентриально мышам FVB в дозах 0,005; 0,025; 0,05; 0,25; 0,5; 1; 2,5 и 5 мкг на 1 г веса. Через 3 часа и 36 часов показана активация перитонеальных нейтрофилов (по маркерам активации CD11b и S100), которая носила четкий бимодальный характер для всех наночастиц.

Ключевые слова: наночастицы, карбид вольфрама, нейтрофилы, активация

Martinova E.A., Baranov V.I.

Murine peritoneal neutrophil activation upon tungsten nanoparticles exposure *in vivo*

Russian Medical Academy of the Post-diploma education, 123995, Moscow, 2/1 Barrikadnaya St., e-mail: e.a.martinova@gmail.com

Two examples of tungsten carbide nanoparticles ($d = 15$ nm, 50 nm) and tungsten carbide nanoparticles with 8% cobalt ($d = 50$ nm) have been found to induce the neutrophil activation 3 h and 36 h after intraperitoneal administration in the doses 0.005; 0.025; 0.05; 0.25; 0.5; 1; 2.5 and 5 microgram per 1 gram body weight to FVB mice. Neutrophil activation was calculated based on the CD11b and S100 antigen expression. Effect of nanoparticles is bimodal for all tested examples.

Key words: nanoparticles, tungsten carbide, neutrophil activation

Нейтрофилы — это гетерогенная популяция клеток, выполняющих фагоцитарную, антибактериальную и иммунорегуляторную роль. В циркуляции обнаружено две субпопуляции, различных по размерам, гранулярности, экспрессии рецепторов (CD11b, Ly6G) и функциональной активности. В перитонеальной полости мышей нейтрофилы представляют собой гомогенную популяцию клеток по размерности и гранулярности, но выделяют две примерно равные по численности субпопуляции по экспрессии рецепторов CD62L⁺/CD43⁺ и CD62L⁻/CD43⁻, рецепторы CD11b, Ly6G, CD14 и CXCR2 экспрессируются на всех нейтрофилах [1]. В активации нейтрофилов принимают участие сигнальные пути ERK1/2, p38 MAPK, Akt, STAT3 [3,9]. Сигнальный путь p38 MAPK/STAT1 сопряжен с созреванием нейтрофилов и их гомеостазом [5]. Активированные нейтрофилы секретируют белок S100, который вовлечен в патогенез воспалительных заболеваний [2]. Белки S100A8 и S100A9 формируют регуляторный комплекс кальпротектин, который защищает ткани от окислительного повреждения свободными радикалами.

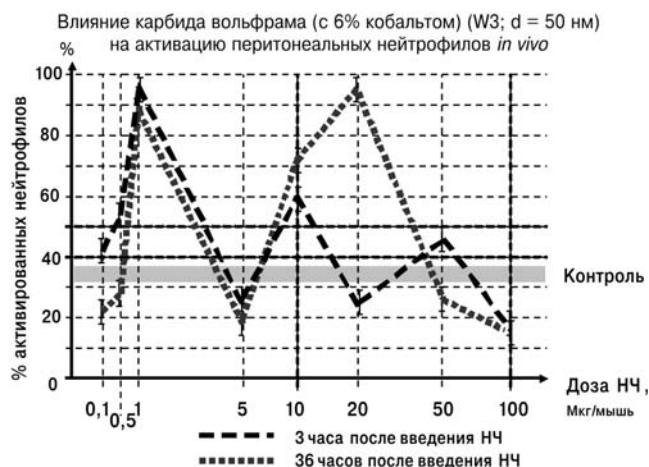
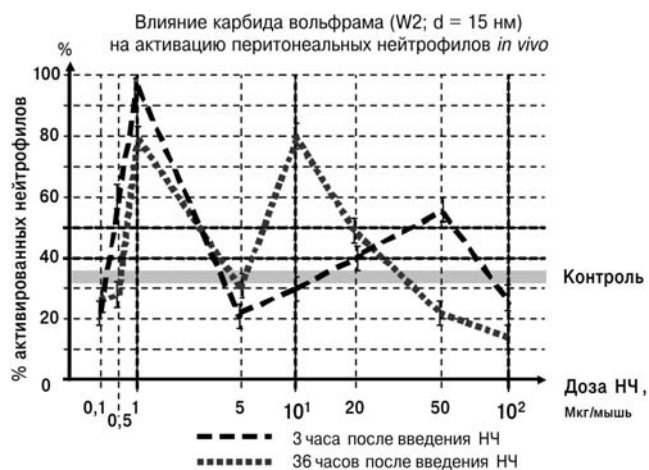
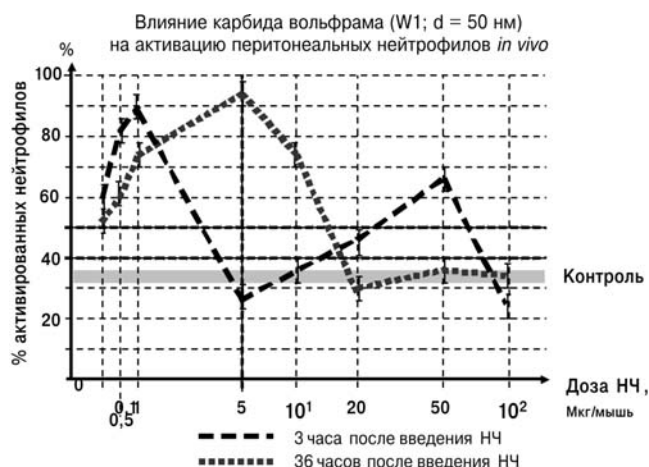
Этот механизм связан с контролем активации рецепторов PAR-2 [8].

Способность к миграции нейтрофилов через эндотелиальный барьер определяется адгезией к клеткам эндотелия. Это сопровождается повышением экспрессии молекул адгезии Mac-1 и CD66b на плазматической мембране нейтрофила [4]. Mac-1 — это гетеродимер, состоящий из двух субъединиц — α (M) (CD11b) и β 2 (CD18), необходимых для адгезии нейтрофилов через эндотелий, миграции в ткани, и для выполнения иммунорегуляторных функций [6]. Повышение экспрессии CD11b является маркером активации нейтрофилов. Mac-1 и LFA-1 относятся к β 2-интегринам, экспрессируемым на плазматической мембране, и за счет взаимодействия с их лигандом ICAM-1 регулирующих миграцию нейтрофилов.

Методика

Использованы нанопорошки карбида вольфрама, охарактеризованные в работе [7]. Символом W1 далее обозначен нанопорошок многокомпонентного карбида вольфрама диаметром (d) 50 нм, удельной поверхностью (S_p) 21—24 м²/г. Символом W2 обозначен нанопорошок монокарбида вольфрама

Для корреспонденции: Мартынова Елена Александровна, e-mail: e.a.martinova@gmail.com



Гистограмма, отражающая изменение процента активированных нейтрофилов перитонеальной полости мышей через 3 ч и 36 ч после введения наночастиц карбида вольфрама.

$d = 15$ нм, $S_p = 6-12$ м²/г. Символом W3 обозначен нанопорошок монокарбида вольфрама с осажденным кобальтом (8% от массы), $d = 50$ нм, $S_p = 9-11$ м²/г. Прирост кислорода за месяц хранения образцов в обычном воздухе составляет $\leq 0,05$ мас.%. Нанопорошки были взвешены в боксе, по 1 мг навесок растворяли в 1 мл H₂O_{bidest}, озвучивали в ультразвуковой бане 1 ч. Для контроля размера наночастиц аликвоты исходных растворов проанализированы с помощью электронной трансмиссионной микроскопии. Перед введением животным исходные растворы наночастиц титровали до соответствующей концентрации в физиологическом растворе, стерилизовали через фильтры $d = 22$ мкм. Наночастицы вводились *стерильно* в объеме 500 мкл в перитонеальную полость мышам в дозах 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 20; 50 и 100 мкг вещества на мышь (0,005; 0,025; 0,05; 0,25; 0,5; 1; 2,5 и 5 мкг на 1 г массы животных).

Работа проведена на мышах линии FVB (самцы, масса 19—20 г). Все эксперименты проводились согласно международным правилам работы с лабораторными животными («Principles of laboratory animal care», 1985, издание Национального Института Здоровья США, №88-23). Мыши получали стандартный гранулированный мышинный комбикорм ПК-120 и питьевую воду *ad libitum*. Животные содержались в отдельной комнате в тишине по 8 штук в клетке, соблюдался 12-часовой режим освещения при постоянной температуре +25°C. Мыши были рандомизированы по группам согласно схеме опыта. Каждая доза нанопорошков была введена 9 мышам с учетом повтором экспериментов. После введения наночастиц животные были гильотинированы через 3 ч (в этот период в перитонеум уже мигрировали популяции клеток, получившие соответствующие стимулы) или через 36 ч (в этот период четко проявляются эффекты, связанные с активацией нейтрофилов).

Перитонеальные клетки были отмыты центрифугированием 10 мин при 200 g, супернатант слит, к осадку добавлено 300 мкл 4% параформальдегида на фосфатном буфере. Для установления процента активированных нейтрофилов перитонеальные клетки отмывали и окрашивали FITC-конъюгированными моноклональными антителами к антигену S100B (PharmMingen) и CD11b (BioLegend), которые считаются маркерами активации нейтрофилов. Флуоресценцию образцов измеряли на проточном цитометре FACSDiva на канале FL1 при длине волны 530 ± 15 нм. В каждом образце анализировали 20 тыс. событий.

Все эксперименты проводились как минимум в трех повторах, полученные данные представлены как $M \pm m$. Данные анализировали по программе ANOVA, сравнение между двумя группами — по

критерию Стьюдента. Для статистического анализа более чем двух групп использовались методы множественного сравнения и критерий Ньюмена—Кейлса. Для этого с помощью дисперсионного анализа проверяют нулевую гипотезу о равенстве всех средних, если она отвергается, то все средние упорядочиваются по возрастанию и сравниваются попарно; $p \leq 0,05$ дается как статистически значимое различие между группами.

Результаты и обсуждение

Процент активированных нейтрофилов (по экспрессии маркеров активации) определялся по отношению в интактному контролю (клетки мышей, которым вводился физиологический раствор). На рисунке представлены гистограммы, отражающие изменение числа активированных нейтрофилов через 3 часа и через 36 часов после введения наночастиц. Следует обратить внимание на высокую степень подобия кривых для карбида вольфрама W1 и W2, различающихся диаметром наночастиц. Принципиальное отличие выявлено только для дозы 0,1 мкг на мышь, которая в случае наночастиц W1 вызывает активацию клеток, а в случае с W2 — ингибирование активации. В целом действие наночастиц карбида вольфрама на перитонеальные нейтрофилы носит бимодальный характер, что установлено и для других показателей. Это может быть объяснено появлением дополнительных внутриклеточных мишеней по мере изменения дозы. Также следует отметить тот факт, что доза наночастиц 1 мкг на мышь, которая во всех проведенных экспериментах вызывала максимальное увеличение числа нейтрофилов в перитонеальной полости, также обуславливает появление максимального процента активированных нейтрофилов для всех исследованных типов наночастиц через 3 часа после их введения мышам внутрибрюшинно. Доза 5 мкг на мышь для всех исследованных наночастиц оказывала негативное влияние на активацию нейтрофилов. Включение 8% кобальта в наночастицы карбида вольфрама W3 приводит к достоверному изменению формы гистограммы, отражающей влияние дозы введенных наночастиц на процент активных нейтрофилов. Появляется

четкий третий пик повышения активности клеток, что указывает на влияние дополнительного включения кобальта в состав наночастиц вольфрама.

Выводы

Наночастицы карбида вольфрама вызывают активацию нейтрофилов перитонеальной полости, эффект носит четкий бимодальный характер.

Список литературы

1. Arnardottir H., Freysdottir J., Hardardottir I. Two circulating neutrophil populations in acute inflammation in mice. *Inflamm. Res.* 2012; 61 (9): 931—9.
2. Cotoi O., Duner P., Ko N. et al. Plasma S100A8/A9 correlates with blood neutrophil counts, traditional risk factors, and cardiovascular disease in middle-aged healthy individuals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2014; 34 (1): 202—10.
3. Hellberg L., Samavedam U., Holdorf K. et al. Methylprednisolone blocks autoantibody-induced tissue damage in experimental models of bullous pemphigoid and epidermolysis bullosa acquisita through inhibition of neutrophil activation. *J. Invest. Dermatol.* 2013; 133 (10): 2390—9.
4. Kim D., Haynes C. On-Chip evaluation of neutrophil activation and neutrophil-endothelial cell interaction during neutrophil chemotaxis. *Anal. Chem.* 2013; 85 (22): 10787—96.
5. Liu G., Hu X., Sun B. et al. Phosphatase Wip1 negatively regulates neutrophil development through p38 MAPK-STAT1. *Blood.* 2013; 121 (3): 519—29.
6. Maiguel D., Faridi M., Wei C. et al. Small molecule-mediated activation of the integrin CD11b/CD18 reduces inflammatory disease. *Sci. Signal.* 2011; 4 (189): 57—67.
7. Samokhin A., Alexeev N., Kornev S., Tsvetkov Yu. W-C nanosized composition synthesis and characterization. *19th International Symposium on Plasma Chemistry, Biochem., Germany.* 2009; 31—2.
8. Sun Y., Lu Y., Engeland C. et al. The anti-oxidative, anti-inflammatory, and protective effect of S100A8 in endotoxemic mice. *Mol. Immunol.* 2013; 53 (4): 443—9.
9. Yan B., Wei J., Yuan Y. et al. IL-6 cooperates with G-CSF to induce protumor function of neutrophils in bone marrow by enhancing STAT3 activation. *J. Immunol.* 2013; 190 (11): 5882—93.

Поступила 15.04.14
Received 15.04.14