

ИЗУЧЕНИЕ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ И МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В РЕЖИМЕ PEAKFORCE QNM

© И.А. ЧЕЛНОКОВА^{1,2}, Б.В. РОНИШЕНКО³, М.Н. СТАРОДУБЦЕВА^{1,2}

¹ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Гомель, Республика Беларусь

²УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Республика Беларусь

³ГНУ «Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: с помощью атомно-силовой микроскопии, используя режим картирования свойств поверхности с наноразмерным разрешением, установить различие численных значений параметров, характеризующих геометрические и механические (адгезионные) свойства неорганических наноразмерных частиц и наноразмерных частиц биологического происхождения.

Материалы и методы. В качестве бионаночастиц использовали экзосомы, выделенные из крови мыши линии Af методом последовательного ультрацентрифугирования. В качестве неорганических наночастиц использовали наночастицы серебра. Наночастицы сканировали на воздухе с помощью атомно-силового микроскопа BioScope Resolve (Bruker) в режиме записи PeakForce QNM in Air с записью карт сил адгезии и топографии изучаемых поверхностей.

Результаты. Наночастицы серебра и экзосомы имели близкие, но статистически различающиеся диаметры ($45,59 \pm 1,04$ нм и $41,25 \pm 0,91$ нм, $p < 0,001$ t-критерий). Тем не менее наночастицы серебра характеризовались большими значениями как высоты, так и площади свободной поверхности в сравнении с соответствующими значениями параметров экзосом. Это приводит к более высокому значению степени распластанности для экзосом (усредненное отношение диаметра к высоте (d/h) равнялось 11,78 для экзосом и 6,67 – для наночастиц ($p < 0,001$, Манн-Уитни критерий), что обусловлено большими в сравнении с наночастицами серебра адгезионными свойствами мембран экзосом и более низким значением отношения объема частицы к ее площади поверхности. Усредненные по наномасштабным участкам поверхности наночастиц силы адгезии были выше $3,2 \pm 0,57$ нН для экзосом в сравнении с наночастицами серебра – $2,2 \pm 0,03$ нН ($p < 0,05$, Манн-Уитни критерий).

Заключение. Выявлены различия параметров геометрических (диаметр, высота, площадь свободной поверхности) и механических свойств (силы адгезии) наночастиц серебра и экзосом, позволяющие с помощью методов атомно-силовой микроскопии идентифицировать и различать эти наночастицы при изучении сложноконтентных биологических сред с возможным содержанием обоих типов наночастиц.

Ключевые слова: наночастицы, экзосомы, атомно-силовая микроскопия.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Челнокова ИА, Ронищенко БВ, Стародубцева МН. Изучение геометрических и механических свойств наночастиц разной природы с помощью атомно-силовой микроскопии в режиме PeakForce QNM. *Проблемы Здоровья и Экологии*. 2020;64(2):143-148.

STUDY OF THE GEOMETRIC AND MECHANICAL FEATURES OF NANOPARTICLES OF VARIOUS NATURE BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY IN PEAKFORCE QNM MODE

© IRINA A. CHELNOKOVA^{1,2}, BOGDAN V. RONISHENKO³, MARIA N. STARODUBTSEVA^{1,2}

¹Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

²Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

³Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

ABSTRACT

Objective: to identify the difference of the numerical values of parameters characterizing the geometric and mechanical (adhesive) properties of inorganic nano-sized particles and nano-sized particles of biological origin by atomic force microscopy using the mode of the mapping of surface features at nano-sized resolution.

Material and methods. Exosomes isolated from the blood of Af mice by the method of sequential ultracentrifugation were used as bionanoparticles. Silver nanoparticles were used as inorganic nanoparticles. The nanoparticles were scanned in air with the help of the BioScope Resolve (Bruker) atomic force microscope in the PeakForce QNM in Air mode with the recording of the maps of adhesion forces and imaging of the topography of the studied surfaces.

Results. The silver nanoparticles and exosomes had similar but statistically different diameters (45.59 ± 1.04 nm and 41.25 ± 0.91 nm, $p < 0.001$ t-test). Nevertheless, the silver nanoparticles were characterized by higher values of both height and free surface area in comparison with the corresponding values of the exosome parameters. This leads to a higher value of the spreading ration for exosomes (the average ratio of diameter to height (d/h) was 11.78 for exosomes and 6.67 for nanoparticles ($p < 0.001$, Mann-Whitney U test) due to greater adhesion properties of the exosome membranes compared to the silver nanoparticles and a lower value of the ratio of the particle volume to its surface area. Averaged over the nanoscale areas of the nanoparticle surface, the adhesion forces of exosomes were higher (3.2 ± 0.57 nN) compared to those of silver nanoparticles (2.2 ± 0.03 nN, $p < 0.05$, Mann-Whitney U test).

Conclusion. The differences in the parameters of the geometric (diameter, height, free surface area) and mechanical properties (adhesion forces) of the silver nanoparticles and exosomes have been revealed, which allows identifying and differentiating of these nanoparticles by the methods of atomic force microscopy during the study of complex biological fluids with possible content of both the types of nanoparticles.

Key words: nanoparticles, exosomes, atomic-force microscopy.

FOR CITATION:

Chelnokova IA, Ronishenko BV, Starodubtseva MN. Study of the geometric and mechanical features of nanoparticles of various nature by atomic force microscopy in PeakForce QNM mode. *Problems of Health and Ecology = Problemy Zdorov'ya i Ekologii*. 2020;64(2):143-148. (In Russ.)

Введение

Бурное развитие нанотехнологий в последние десятилетия, способствующее широкому и всестороннему изучению свойств наноразмерных объектов разной природы и возможности их использования в медицине, привело к формированию целого нового направления - наномедицины. Благодаря своим свойствам наночастицы находят применение как в фармакологической отрасли, так и в медицине для диагностических и терапевтических целей.

Создание наночастиц со свойствами, требуемыми для таргетной доставки лекарственных препаратов в клетку-мишень, является одним из важнейших направлений в области биотехнологий. Это позволит решить ряд важных проблем их применения в молекулярной терапии: снижение ксенобиотического воздействия на клетки, не являющиеся мишенями, доставка лекарственного препарата точно в клетку-реципиент и увеличение его концентрации, тем самым повышая эффективное действие препарата на организм в целом [1]. Среди перспективных наночастиц для таргетной доставки лекарственных препаратов рассматривают как неорганические твердые наночастицы, так и липосомы и экзосомы.

В диагностике широко применяются металлические наночастицы, способные поглощать и отражать падающее электромагнитное излучение. Данные свойства позволяют использовать их в качестве контрастируемых агентов в магнитно-резонансной и компьютерной рентгеновской томографии для получения более информативных снимков. Для данных целей подходят наночастицы золота и серебра ввиду их высокой биосовместимости и относительной простоты в получении. Кроме этого наноразмерные частицы серебра обладают антибактериальным эффектом [2]. Неорганические наночастицы, например, частицы серебра представляют собой твердый достаточно однородный нанораз-

мерный кусок металла. Наряду с наночастицами неорганического происхождения для диагностических целей применяют частицы биологического происхождения, которые могут также являться и маркерами различных заболеваний. К данным частицам можно отнести экзосомы, образующиеся в организме путем слияния мультивезикулярных телец с мембраной. Размеры экзосом варьируют от 40 до 100 нм [3]. В том числе и благодаря своим наноразмерам, экзосомы циркулируют по всему организму и определяются во всех его жидких средах (слюна, плазма, грудное молоко, моча, слезная жидкость, сперма и др.). Экзосомы представляют собой окруженные биологической мембраной сферические структуры с различным набором ферментов и РНК, которые выделяют клетки в межклеточное пространство с целью межклеточной коммуникации. Состав их мембраны достаточно сложен и зависит от состояния и типа продуцирующей их клетки. В организме неорганические наночастицы и экзосомы могут циркулировать одновременно [4]. Из-за наноразмерных масштабов идентификация наночастиц разной природы невозможна с помощью методов световой микроскопии. Распознавание наночастиц возможно методами атомно-силовой микроскопии (АСМ), проточной цитометрии, электронной микроскопии, динамического светорассеяния и др. Каждый из методов определения наночастиц имеет свои достоинства и недостатки. При АСМ нет возможности «увидеть» внутреннее строение наночастицы, как это возможно в методе просвечивающей электронной микроскопии, когда возможно выявить различие экзосом от наночастиц серебра по наличию у экзосом мембраны и жидкого содержимого. Однако оценка наночастиц методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методами. В первую очередь, АСМ позволяет проводить измерения как в жидкости, так и на возду-

хе, предоставляя различные возможности для исследований. Во-вторых, с помощью этого метода можно получать реальные трёхмерные изображения поверхности объекта с наноразмерным разрешением, что позволяет дать более полную морфологическую оценку исследуемому объекту. В-третьих, АСМ дает возможность оценить механические характеристики поверхности, такие как адгезия, модуль упругости, диссипация и др., позволяющие дать предположительную оценку взаимодействия клеток с наночастицами и степени их эффективности использования наночастиц в качестве «оболочки» для таргетной доставки лекарств в данный тип клеток.

Цель исследования

С помощью атомно-силовой микроскопии, используя режим картирования свойств поверхности с наноразмерным разрешением, установить различие численных значений параметров, характеризующих геометрические и механические (адгезионные) свойства неорганических наноразмерных частиц и наноразмерных частиц биологического происхождения.

Материалы и методы

В качестве бионаночастиц использовали экзосомы (внеклеточные везикулы размером менее 150 нм), выделенные из крови мыши линии Af методом последовательного ультрацентрифугирования. Животные содержались в стационарных условиях вивария ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси» на полноценном стандартном пищевом рационе и со свободным доступом к воде, согласно установленным нормам. Все экспериментальные работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными и правилами Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 года. Смешанную артериально-венозную кровь, полученную при декапитации на фоне глубокого эфирного наркоза, объемом 2 мл вносили в пробирку с 3,2% раствором 2-замещенного цитрата натрия в соотношении 9:1. Форменные элементы осаждали центрифугированием в течение 10 мин. при 300 g и 4 °C. Супернатант повторно центрифугировали в течение 20 мин. при 2000 g и 4 °C. Для удаления клеточного дегриса к образцам плазмы

прибавляли 10 мл фосфатно-солевой буфер (ФСБ) и центрифугировали при 10000 g, 4 °C в течение 30 минут. Для осаждения экзосом к супернатанту прибавляли 3 мл ФСБ и центрифугировали дважды при 100000 g, 4 °C в течение 70 минут. 100 мкл осадка с экзосомами ресуспендировали в 900 мкл ФСБ, наносили на поверхность свежесколотой слюды и высушивали на воздухе (25 °C, $\phi = 55\%$). В качестве неорганических наночастиц использовали наночастицы серебра, приготовленные по следующей методике: в 50 мл деионизованной воды добавляли 42 мг гидрокарбоната натрия, 15 мг цитрата натрия и 450 мг глюкозы до полного растворения. Затем при перемешивании добавляли 640 мкл раствора нитрата серебра (4 мг/мл) и выдерживали 4 часа на ультразвуковой бане. Раствор наночастиц диализовали против 2,5 мМ цитрата натрия. Наночастицы наносили на поверхность модифицированной полиэтиленмином кремниевой подложки путем ее выдерживания в растворе наночастиц.

Наночастицы сканировали на воздухе при комнатной температуре (22 °C, $\phi = 65\%$) с помощью атомно-силового микроскопа BioScope Resolve (Bruker) в режиме записи PeakForce QNM in Air, иглой-зондом SCANASYST-AIR (радиус закругления 2 нм). В каждой точке скана (размер области сканирования – 1 × 1 мкм, разрешение – 256 × 256 пикселей, скорость записи – 0,5 Hz) проводилась запись силовой кривой, по параметрам которой одновременно с записью скана проводилась оценка силы адгезии в выбранной точке. Карта сил адгезии вносилась в отдельный канал записи одновременно с записью топографических карт изучаемых поверхностей. Обработка полученных сканов проводилась с помощью программы NanoScopeAnalysis 1.8. Для изучения адгезионных свойств рассматривались 120 участков наночастиц размером 25 × 25 нм. Для оценки геометрических характеристик наночастиц использовалась функция Particle Analysis. Числовые данные представлены в виде среднего значения и границ 95% доверительного интервала в случае нормального распределения и медианы (Me) и границ интерквартильного интервала (Q¹; Q³) при распределении, не подчиняющемся распределению Гаусса. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы SPSS Statistics 17.0, построение графика – в «Statistica», 10.0. Оценку нормальности распределения числовых данных проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Сравнительный анализ прово-

дился с использованием критериев Манна-Уитни, t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

С помощью метода АСМ исследовали наночастицы неорганического и биологического происхождения на кремниевых подложках. Для каждого образца определя-

ли геометрические параметры: площадь (a), высоту (h), диаметр (d), отношение (d/h) и силы адгезии (F_a). Типичные АСМ-изображения изученных наночастиц представлены на рисунке 1.

Следует отметить, что наночастицы серебра при сравнимых с экзосомами диаметрах имеют значительно большую высоту (таблица 1).

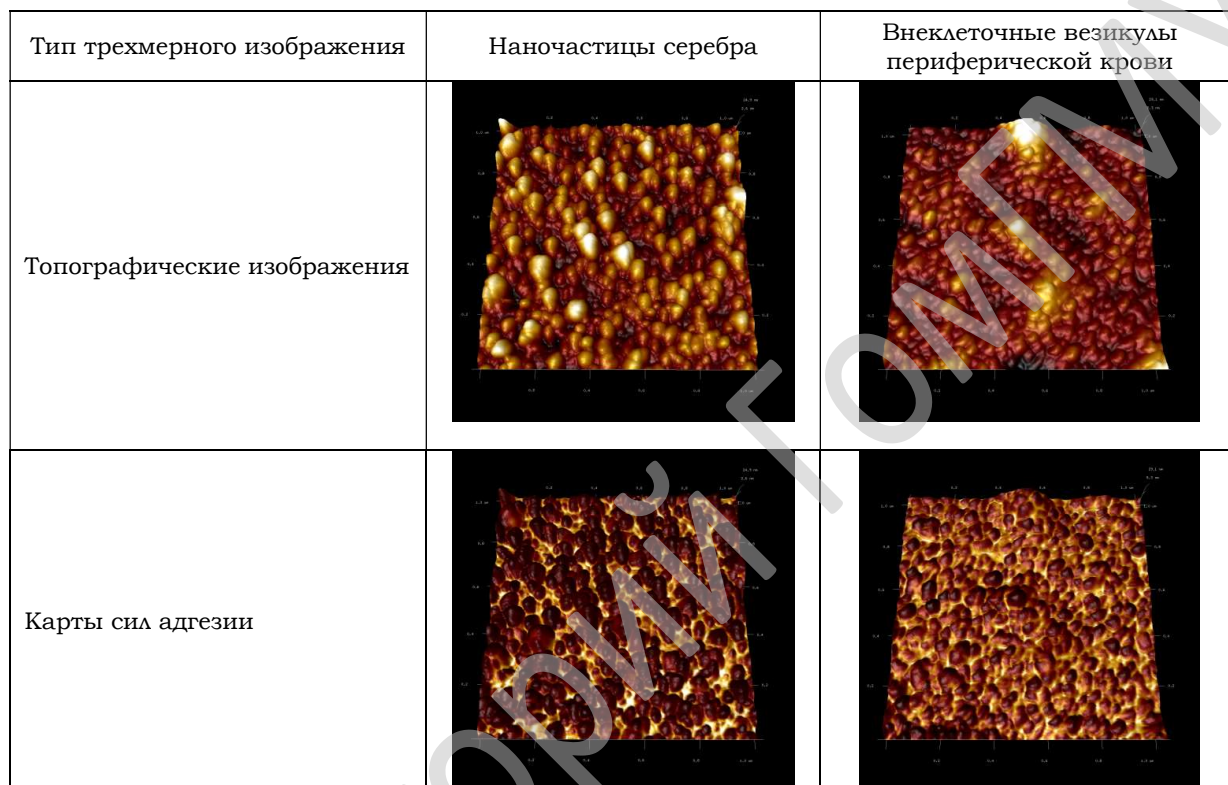


Рисунок 1 – Трёхмерные АСМ-изображения наночастиц серебра и экзосом на кремниевых подложках (размер области сканирования – 1 мкм × 1 мкм)

Таблица 1 – Геометрические параметры биологических и неорганических наночастиц

Параметр	Тип наночастиц	
	наночастицы серебра (n = 40)	бионаночастицы (n = 40)
Площадь (a), нм ²	1704,79 ± 81,39	1335,67 ± 61,01*
Высота (h), нм	8,05 ± 0,51	3,56 ± 0,22**
Диаметр (d), нм	45,59 ± 1,04	41,25 ± 0,91**

* – различия являются статистически значимыми по сравнению с группой наночастиц серебра при p < 0,017 (t-критерий Стьюдента); ** – различия являются статистически значимыми в сравнении с группой наночастиц серебра при p < 0,001 (t-критерий Стьюдента)

Для более полной оценки морфологической характеристики наночастиц нами был оценен параметр d/h. Значение параметра было больше у экзосом (11,78 (8,88; 20,65)), чем у наночастиц серебра (6,67 (4,44; 7,99), p < 0,001, критерий Манна-Уитни). Данное различие может объясняться трансформацией округлой формы экзосом в более

распластанную при иммобилизации экзосом на подложке вследствие меньшего значения отношения объема к площади поверхности и больших сил взаимодействия поверхности экзосом с электрически заряженной кремниевой пластинкой в сравнении с параметрами, характерными для твердых наночастиц серебра.

Наночастицы изученных типов существенно различались по механическим свойствам (силе адгезии) (рисунок 2).

Наночастицы серебра характеризуются меньшими значениями усредненных по наномасштабным участкам поверхности сил адгезии в сравнении с силами адгезии, присущими поверхности экзосом.

Результаты исследования показывают возможность различить наночастицы различного происхождения (например, наночастицы серебра и экзосомы крови), тестируя их поверхность с помощью щупа (иглы) атомно-силового микроскопа и измеряя ряд АСМ-параметров на наномасштабе.

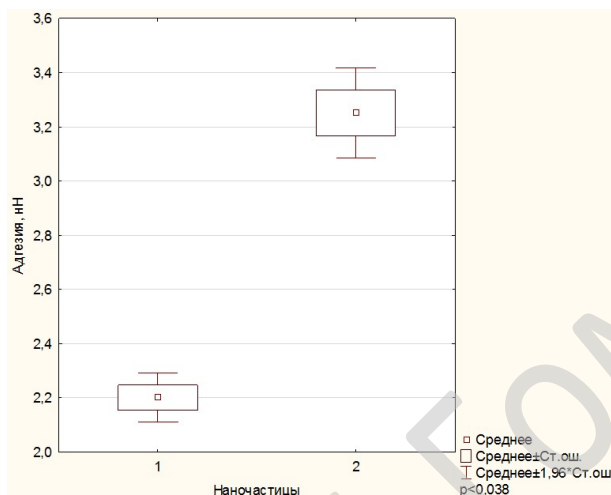


Рисунок 2 – Значения сил адгезии у наночастиц неорганического (1) и органического (2) происхождения

Заключение

Выявлены различия параметров геометрических (диаметр, высота, площадь свободной поверхности) и механических свойств (сил адгезии) наночастиц серебра и экзосом, позволяющие с помощью методов атомно-силовой микроскопии идентифицировать и различать эти наночастицы при изучении сложнокомпонентных биологических сред с возможным содержанием обоих типов наночастиц.

Авторы благодарят за финансовую поддержку БРФФИ (проект Б20Р-427).

ЛИТЕРАТУРА

1. Постнов ВН, Наумышева ЕБ, Королев ДВ, Галагудза ММ. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов. *Биотехносфера*. 2013;6(30):17-27.
2. Мамучиева МБ, Компанцев ДВ, Саградян ГВ. Современные аспекты использования наноматериалов в бальнеологии и медицине (обзор литературы). *Научные Ведомости БелГУ*. 2017;19 (268):20-28.
3. Hartjes TA, Mytnyk S, Jenster GW, van Steijn V, van Royen ME. Extracellular vesicle quantification and characterization: common methods and emerging approaches. *Bioengineering (Basel)*. 2019;6:7. doi: 10.3390/bioengineering6010007

4. Самойлова ЕМ, Кальсин ВА, Беспалова ВА, Девиченский ВМ, Баклаушев ВП. Экзосомы: от биологии к клинике. *Гены и Клетки*. 2017;4:7-19.
5. Chernyshev VS, Rachamadugu R, Tseng YH, Belnap DM, Jia Y, Branch KJ, Butterfield AE, Pease LF, Bernard PS, Skliar M. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407:3285-3301. doi: 10.1007/s00216-015-8535-3

REFERENCES

1. Postnov VN, Naumysheva EB, Korolev DV, Galagudza MM. Nanoscale drug delivery vehicles. *Biotechnosphere*. 2013;6 (30):17-27. (in Russ.)
2. Mamuchieva MB, Kompantsev DV, Sagradyan GV. Modern aspects of the use of nanomaterials in balneology and medicine (literature review). *Scientific reports of BelSU*. 2017;19(268):20-28. (in Russ.)
3. Hartjes TA, Mytnyk S, Jenster GW, van Steijn V, van Royen ME. Extracellular vesicle quantification and characterization: common methods and emerging approaches. *Bioengineering (Basel)*. 2019;6:7. doi: 10.3390/bioengineering6010007
4. Samoilova EM, Kalsin VA, Bepalova VA, Devichensky VM, Baklaushev VP. Exosomes: from biology to the clinic. *Genes and Cells*. 2017;4:7-19. (in Russ.)
5. Chernyshev VS, Rachamadugu R, Tseng YH, Belnap DM, Jia Y, Branch KJ, Butterfield AE, Pease LF, Bernard PS, Skliar M. Size and shape characterization of hydrated and desiccated exosomes. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407:3285-301. doi: 10.1007/s00216-015-8535-3.

Поступила 20.04.2020
Received 20.04.2020

Принята в печать 24.06.2020
Accepted 24.06.2020

Сведения об авторах:

Челнокова Ирина Александровна – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальных биологических моделей ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси», ассистент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии УО ГомГМУ; e-mail: irenachelnokova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-6812-753X>

Ронищенко Богдан Вячеславович – научный сотрудник лаборатории химии биоконъюгатов отдела органической химии ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси»; e-mail: ranishenka@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9822-6934>

Стародубцева Мария Николаевна – д.б.н., профессор кафедры медицинской и биологической физики УО ГомГМУ, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальных биологических моделей ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси»; e-mail: marysta@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8516-0884>

Автор, ответственный за переписку:

Челнокова Ирина Александровна – e-mail: irenachelnokova@gmail.com

Information about authors:

Irina A. Chelnokova – Junior researcher at the Laboratory of Experimental Biological Models of the SSI «Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus», Assistant lecturer at the Department of Histology, Cytology and Embryology of the EI «Gomel State Medical University»; e-mail: irenachelnokova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-6812-753X>

Bogdan V. Ronishenko – Researcher at the Laboratory of Bioconjugate Chemistry of the Department of Organic Chemistry of the SSI «Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus»; e-mail: ranishenka@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9822-6934>

Maria N. Starodubtseva – Doctor of Biological Sciences, Professor at the Department of Medical and Biological Physics of the EI «Gomel State Medical University», Leading researcher at the Laboratory of Experimental Biological Models of the SSI «Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus»; e-mail: marysta@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8516-0884>

Corresponding author:

Irina A. Chelnokova – e-mail: irenachelnokova@gmail.com