

ИЗУЧЕНИЕ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ МЕХАНИЗМА ПРОНИКНОВЕНИЯ КОМПЛЕКСА ОДНОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК С ДНК В КЛЕТКИ ГЛИОМЫ КРЫСЫ С6

¹И. А. Челнокова, ^{1,2}М. Н. Стародубцева, ^{3,4}Е. Н. Голубева, ³Т. А. Кулагова,
⁴М. В. Шуба, ⁴О. Г. Поддубская

¹ГНУ «Институт радиобиологии НАН Беларуси», г. Гомель, Республика Беларусь,
irenachelnokova@gmail.ru

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

³Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

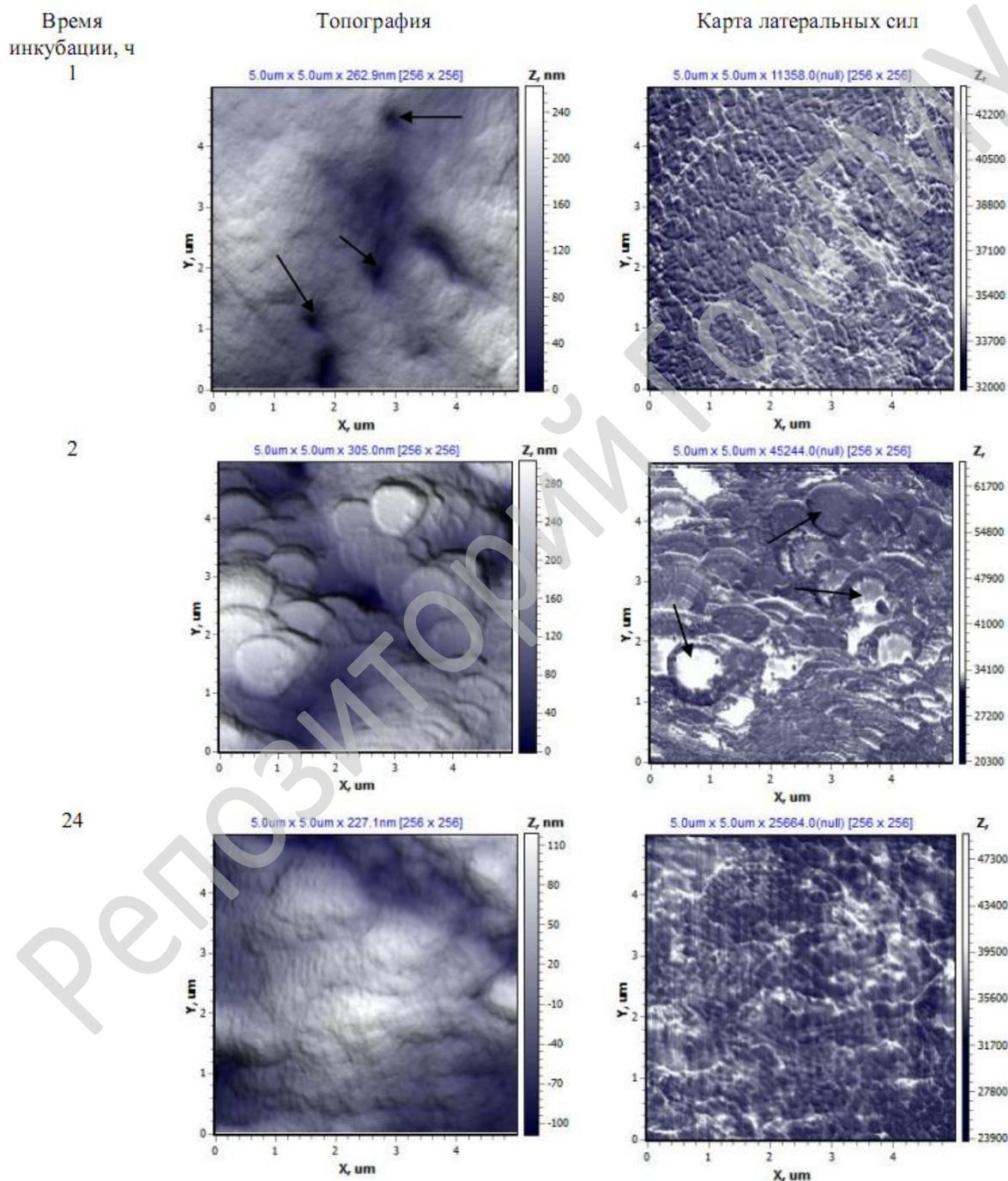
⁴НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Углеродные нанотрубки считаются одним из классов наноматериалов, перспективных для биологического и медицинского применения, например, для визуализации различных структур на разных уровнях иерархической организации организма, разработки различных биосенсоров и носителей для целевой доставки лекарственных средств, а также улучшения методов лучевой и фототермической терапии. Механизмы взаимодействия углеродных нанотрубок с клетками сложны и зависят от свойств как самих нанотрубок, так и типа клеток [1]. Для прогресса в разработке нового метода терапии злокачественных опухолей головного мозга, основанного на фототермолизе клеток нервной ткани с участием нанотрубок, важно знать механизмы проникновения нанотрубок как в нейроны, так и в клетки нейроглии. Популяция клеток глиомы крысы (клеточная линия С6) состоит из астроцитов (около 90%) и олигодендроцитов. Астроциты являются клетками макроглии, выполняющими разграничительную и трофическую функции в тканях мозга. Они изолируют нейроны и кровеносные сосуды и участвуют в образовании гематоэнцефалического барьера, а также обеспечивают обмен веществ между кровью и нейронами.

Целью работы являлось изучение механизма проникновения в клетки глиомы крысы (клеточная линия С6) комплекса одностенных углеродных нанотрубок с ДНК (ДНК-ОУНТ) с помощью методов атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Материалы и методы. Клетки глиомы крысы линии С6 высевали на стекла, через 8 часов добавляли комплекс ОУНТ-ДНК в концентрации 4,5 мкг/мл. В контрольных образцах в качестве добавки использовали физиологический раствор. Образцы клеток выдерживали 1, 2, 18 и 24 часа, фиксировали структуру с помощью 1% раствора глутарового альдегида и высушивали на воздухе. Морфологию химически фиксированных и окрашенных по Романовского-Гимзе клеток исследовали с помощью светового микроскопа Nikon Eclipse E200. АСМ-исследования поверхности клеток проводили на атомно-силовом микроскопе «НТ-206» («Микротестмашины», Беларусь) в режимах записи карт рельефа и карт латеральных сил при контактном методе сканирования иглой-зондом CSC38 (MikroMasch, Эстония): уровень В, коэффициент жесткости 0,03 Н/м ($22 \pm 5^\circ\text{C}$, влажность $55 \pm 10\%$) на воздухе. Обработку АСМ-данных осуществляли с помощью программы SurfaceExplore 1.3.11 («Микротестмашины», Беларусь). Оценивали силы трения (скольжения) и шероховатость карт сил трения, а также шероховатость рельефа на участках поверхности размером 2,5 мкм × 2,5 мкм (256 × 256 пикселей). Силы трения рассчитывали как полуразность латеральных сил при прямом и обратном проходе иглы-зонда в пределах площади участка поверхности клеток (2,5 мкм × 2,5 мкм) [2].

Результаты исследования и их обсуждение. При инкубации клеток с комплексом ДНК-ОУНТ в течение 1–2 ч структура пространственного распределения механических свойств поверхности клеток характеризуется наличием структурных элементов, размеры которых соответствуют размерам (длине) используемых в опыте ОУНТ (150–200 нм). На поверхности клеток (на топографических картах участков поверхности) явно различимы инвагинации (на рисунке указаны стрелками) соответствующих размеров, что свидетельствует о процессах эндоцитоза комплекса ДНК-ОУНТ клетками (рисунок, время инкубации – 1 ч).



Топографические изображения и карты латеральных сил участков поверхности глиальных клеток линии С6 после их инкубации с комплексом ДНК-ОУНТ

В последующие 18–24 ч указанные структурные элементы исчезают, и существенно увеличивается доля наноразмерных элементов, характерных для актинового цитоскелета (рисунок, время инкубации – 24 ч). Инкубация клеток с комплексом ДНК-ОУНТ в течение 1 часа ведет к уменьшению значения шероховатости их поверхности до $R_q = 43$ (31; 53) нм (в сравнении с шероховатостью контрольного образца $R_q = 69$ (51; 81) нм; $p = 0,005$, критерий Манн-Уитни). С увеличением времени инкубации значение шероховатости клеточной поверхности становится статистически неотличимым от значений шероховатости, характерных для контрольных клеток. При этом на АСМ-изображениях участков поверхности клеток, проинкубированных 2 ч и более с комплексом ДНК-ОУНТ, наблюдаются крупные сферические структуры с относительно мягким содержимым, ограниченные мембраной, особо заметные в режиме записи карт латеральных сил (рисунок, время инкубации – 2 ч). Эти сферические мембранные образования (на рисунке указаны стрелками), крупные из которых наблюдаются и в световой микроскоп, могут соответствовать фаголизосомам, образовавшимся из эндосом с нанотрубками.

Наблюдаемые структурные изменения поверхностного слоя клеток, обработанных комплексом ДНК-ОУНТ, на нано- и микроуровнях свидетельствуют об индуцированных нанотрубками изменениях структуры кортикального актинового цитоскелета. Реорганизация кортикального цитоскелета ведет к изменению механических параметров микромасштабных участков поверхности клеток. Параметры (среднее значение и шероховатость) карт механических свойств (карт сил трения скольжения) для поверхности обработанных ДНК-ОУНТ клеток в течение 1 часа были значительно меньше $F_f = 675$ (587; 838) усл. ед. в сравнении с соответствующим параметром для контрольных клеток $F_f = 1134$ (808; 1189) усл. ед. ($p < 0,001$, критерий Манн-Уитни). С увеличением времени инкубации значения параметров сил трения увеличиваются (для 24 ч $F_f = 1526$ (989; 1908) усл. ед.) и становятся больше значений параметров, характерных для контрольных клеток (для 24 ч $F_f = 708$ (576; 1007) усл. ед., $p = 0,004$, критерий Манн-Уитни).

Заключение. Данные, полученные методом атомно-силовой микроскопии, свидетельствуют о том, что механизмы поступления комплекса ДНК-ОУНТ в астроглиальные клетки включают механизмы эндоцитоза и формирования фаголизосом. При этом активация процессов фагоцитоза приводит к изменению механических свойств поверхности астроглиальных клеток.

Литература

1. **Неверова, М. А.** Возможности биомедицинского применения углеродных нанотрубок в медицине / М. А. Неверова, Е. А. Буракова // Бюллетень сибирской медицины, 2017. – С. 152–154.
2. **Nano- and microscale mechanical properties of erythrocytes in hereditary spherocytosis.** / M. N. Starodubtseva et al. // J. Biomech. – 2019. – Vol. 83. – P. 1–8.