

## КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ НА АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ГИБРИДНЫХ МИКРОЧАСТИЦ ВАТЕРИТА С РАЗЛИЧНЫМИ ПОЛИСАХАРИДАМИ

*Д.В. Григорьева<sup>1\*</sup>, Е.В. Михальчик<sup>2</sup>, Д.В. Мосиевич<sup>3</sup>, П.И. Мишин<sup>3</sup>,  
Н.Г. Балабушевич<sup>3</sup>, О.М. Панасенко<sup>2</sup>, А.В. Соколов<sup>2,4</sup>, И.В. Горудко<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет,

220030, Беларусь, Минск, пр. Независимости, 4; \*эл. почта: dargr@tut.by

<sup>2</sup>Научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина,  
119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

<sup>3</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
119991, Москва, Ленинские горы, 1

<sup>4</sup>Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева,  
197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/1

В последнее время для разработки новых систем доставки лекарств всё чаще используют носители на основе природных биоминералов. В данной работе были исследованы эффекты нативных (CC) и гибридных микрочастиц ватерита с включением декстрансульфата (CCDS), хондроитинсульфата (CCCS), гепарина (CCHE), фукоидана (CCFU) и пектина (CCPE) на жизнеспособность и функциональную активность нейтрофилов. Среди протестированных препаратов только CCFU оказывали небольшое цитотоксическое действие. Сами по себе CC стимулируют реорганизацию актинового цитоскелета, а также продукцию активных форм кислорода (АФК) клетками, которая снижалась в присутствии хлорида дифенилениодония (DPI), ингибитора сборки NADPH-оксидазы. CC-индуцированная активация NADPH-оксидазы снижалась в присутствии ингибиторов нерецепторных тирозинкиназ семейства Src, фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K) и фосфолипазы C (PLC). Подобно нативным CC, гибридные микрочастицы ватерита также инициировали продукцию АФК нейтрофилами. После добавления CC и гибридных микрочастиц ватерита (за исключением CCDS) было зарегистрировано увеличение количества нейтрофилов, характеризующихся большими значениями величины бокового светорассеяния, что свидетельствует об изменении морфологических характеристик клеток. Учитывая способность гибридных микрочастиц ватерита с полисахаридами активировать NADPH-оксидазу нейтрофилов, они представляются перспективными системами для доставки антибактериальных и противовирусных препаратов.

**Ключевые слова:** микрочастицы ватерита; полисахариды; нейтрофилы; цитотоксичность; NADPH-оксидаза

**DOI:** 10.18097/PBMC1561

#### ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия в области биомедицинских технологий опубликовано огромное количество работ, посвящённых разработке новых стратегий доставки лекарств, однако трансляция фундаментальных исследований в клиническую практику идёт достаточно медленно, что связано с проблемами биосовместимости и безопасности, сложными процедурами утверждения и государственного регулирования лекарственных препаратов. В связи с этим исследователи обращают внимание на системы доставки на основе материалов, которые уже одобрены для биомедицинского использования. Один из них — карбонат кальция ( $\text{CaCO}_3$ ) [1]. Этот нетоксичный природный биоминерал используется в качестве безопасного буферного агента для пищевых продуктов, средств гигиены и косметики.  $\text{CaCO}_3$  может существовать в виде нескольких полиморфов, среди которых в последнее время особое внимание исследователей заслужил ватерит.

Ватерит имеет ряд преимуществ относительно других форм  $\text{CaCO}_3$  для биомедицинского применения. Его отличают лёгкость получения, размер частиц, регулируемый условиями синтеза, пористая структура, позволяющая включать в ватерит различные биологически активные молекулы, мукоадгезивные свойства [2], способность легко растворяться в жидкостях организма (например, при низком значении pH). Благодаря этим свойствам ватерит претендует на роль перспективного контейнера для доставки лекарственных препаратов. Однако ватерит не лишён и недостатков, которые ограничивают его применение. Среди них стоит отметить присущую ватериту метастабильность, довольно быструю перекристаллизацию в водных средах в более стабильный кальцит, а также быстрое высвобождение положительно заряженных молекул [1]. Эти недостатки могут быть устранены дополнительным введением полимеров при формировании микрочастиц ватерита (CC) и получением так называемых “гибридных” CC [3–5]. Модификация CC различными биополимерами приводит не только к изменению их физико-химических свойств (площадь поверхности,



размер пор, дзета-потенциал) [3, 5], но также может оказывать дополнительный терапевтический эффект. Например, показано, что в присутствии микрочастиц ватерита с пектином (CCPE) рост бактерий *E. coli* лабораторного штамма Mg1655 усиливался, а рост бактерий клинического изолята от пациента с болезнью Крона SharL, наоборот, снижался; при этом нарушалась проницаемость клеточной стенки бактерий вследствие её повреждения, о чём свидетельствовало увеличение концентрации внеклеточного АТР [6]. Включение декстрана и его производных в состав СС усиливало их адгезию к эндотелиальным клеткам [7, 8].

В последнее время достигнуты значительные успехи в разработке способов иммобилизации в ватерит широкого спектра биологически активных веществ, таких как белки [9], в том числе ферменты [10], РНК [11], синтетические препараты [1], в том числе противогрибковые и неорганические наночастицы [8, 12].

Однако для эффективного использования данных носителей в качестве средств доставки лекарственных препаратов необходим всесторонний анализ их влияния на клетки, которые, прежде всего, вовлечены в воспалительные реакции организма. Это связано с тем, что введение в организм микро/наноразмерных структур может приводить к активации клеток иммунной системы.

Нейтрофилы, или полиморфно-ядерные гранулоциты, — наиболее многочисленная популяция из циркулирующих в кровотоке иммунных клеток. Они первыми попадают в очаги воспаления, где выполняют антимикробные эффекторные функции, включающие: фагоцитоз, генерацию активных форм кислорода (АФК) и галогенов (АФГ), дегрануляцию с секрецией цитотоксических ферментов гранул (миелопероксидазы (МПО), эластазы, лизоцима и др.) и высвобождение нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), которые улавливают микроорганизмы для их изоляции и предотвращения последующего распространения. На настоящий момент влияние гибридных СС на нейтрофилы изучено недостаточно. Показано, что гибридные СС с муцином активируют генерацию АФК нейтрофилами, агрегацию этих клеток, а также образование НВЛ-подобных структур [13]. Включение пектина в СС отменяет эффект адсорбированного муцина на активацию нейтрофилов [14].

Важно отметить, что гибридные СС не только более стабильны в биологических средах и более эффективно удерживают доставляемые соединения (например, катионные молекулы), но и способны проявлять дополнительную биологическую активность благодаря самим полимерам. Недавно был синтезирован и охарактеризован ряд гибридных СС с различными полисахаридами [3], свойства которых зависят от природы включённого в их состав полисахарида. В данной работе впервые проведён сравнительный анализ влияния гибридных СС с декстрансульфатом (CCDS), хондроитинсульфатом (CCCS), гепарином (CCHE), пектином (CCPE), фукоиданом (CCFU) на функциональную активность нейтрофилов.

## МЕТОДИКА

### Реагенты

В работе использовали фукоидан (FU) из *Fucus vesiculosus* (20–200 кДа, содержание серы 7–11%), пектин (PE) из яблок (30–100 кДа, степень этерификации 50–75%, 6,7% метоксигрупп, 74% галактуроновой кислоты), хондроитинсульфат А (CS) из трахей быков (20–30 кДа), скополетин, пероксидазу хрена, форбол 12-миристинат 13-ацетат (PMA), NaOCl, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), гистопак-1077, декстран Т70, трипановый синий, метоксиверапамил, NiCl<sub>2</sub>, 4-амино-5-(4-хлорфенил)-7-(*t*-бутил)пиразоло[3,4-*d*]пиримидин (PP2), вортманнин, цитохалазин b (cyt b), 1-[6-((17β-3-метоксистер-1,3,5(10)-триен-17-ил)амино)гексил]-1Н-пиррол-2,5-дион (U73122), тритон X-100, водную монтажную среду Fluoromount и этиленгликоль-бис(β-аминоэтиловый эфир) N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты (EGTA; “Sigma-Aldrich”, США); декстрансульфат (DS) *Leuconostoc* ssp. (500 кДа, 2,3 сульфогруппы на звено; “Fluka”, Германия); гепарин (HE) (10–20 кДа; “Spofa”, Чехия); параформальдегид (“Panreac”, Испания); поли-L-лизин (“Santa Cruz Biotechnology”, США); фура-2АМ, 2',7'-дихлородицианфлуоресцеин диацетат (H<sub>2</sub>DCFDA), пропидиум йодид (PI), конъюгированный Alexa Fluor 488 фаллоидин и хлорид дифениленидона (DPI; “Molecular Probes”, Нидерланды); наборы ЛДГ-2-ОЛЬВЕКС и КАЛЬЦИЙ-ОЛЬВЕКС (“ОЛЬВЕКС ДИАГНОСТИКУМ”, Россия). Остальные реактивы были производства “Реахим” (Россия) и “Белмедпрепараты” (Беларусь).

### Получение нативных и гибридных микрочастиц ватерита

Нативные и гибридные СС были получены методом спонтанной кристаллизации путём смешивания растворов CaCl<sub>2</sub> и Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 0,05 М трис-буфере (рН 7,0), как это было описано ранее [3, 5]. Для синтеза гибридных СС с полисахаридами предварительно смешивали раствор CaCl<sub>2</sub> с полисахаридами. Осадки нативных и гибридных СС промывали бидистиллированной водой и высушивали лиофильно. Средний диаметр сферических нативных и гибридных СС, который определяли методом сканирующей электронной микроскопии (микроскоп Zeiss Merlin, “Zeiss”, Германия), составил: для СС 3,6±0,7 мкм, для CCDS 3,8±0,8 мкм, для CCCS 1,9±0,5 мкм, для CCHE 2,0±0,3 мкм, для CCFU 2,1±0,5 мкм, для CCPE 2,3±0,7 мкм [3]. Дзета-потенциал нативных и гибридных СС, который изучали методом динамического светорассеяния на установке Malvern Zetasizer Nano ZS (“Malvern Panalytical”, Великобритания), составил: для СС 2±1 мВ, для CCDS -13±2 мВ, для CCCS -12±2 мВ, для CCHE -9±2 мВ, для CCFU -12±2 мВ, для CCPE -12±2 мВ [3].

### Выделение нейтрофилов

Нейтрофилы выделяли из венозной крови здоровых доноров, полученной в Республиканском

научно-практическом центре трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Минск, Беларусь), как описано в [15]. Кровь, стабилизированную цитратом натрия (109 мМ) в соотношении 9/1 (v/v), смешивали с 6% декстраном Т70 в соотношении 5/1 (v/v) и выдерживали в течение 40 мин для оседания эритроцитов. Остатки эритроцитов в обогащённой лейкоцитами плазме удаляли осмотическим лизисом путём добавления к клеточной взвеси последовательно 3 мл 0,2% NaCl и 3 мл 1,6% NaCl, содержащего 20 мг/мл D-глюкозы. Обогащённую лейкоцитами плазму наслаивали на гистопак-1077 и центрифугировали при 450 g в течение 15 мин. Осадок нейтрофилов отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ: 137 мМ NaCl, 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,7 мМ KCl, pH 7,4) и ресуспендировали в 1 мл ФСБ, содержащего 1 мг/мл D-глюкозы. Выделенная таким образом клеточная суспензия обычно содержала не менее 95% нейтрофилов, жизнеспособность которых по тесту с трипановым синим составляла не менее 95%.

#### Оценка жизнеспособности нейтрофилов

Для оценки влияния нативных и гибридных СС на жизнеспособность нейтрофилов, клетки ( $1 \times 10^6$  кл/мл) в ФСБ, содержащем 1 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 0,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , инкубировали в течение 1 ч при 37°C с тестируемыми образцами или полисахаридами в концентрации 0,25 мг/мл, после чего к образцам добавляли PI (1 мкг/мл) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре в защищённом от света месте. В качестве положительного контроля использовали хлорноватистую кислоту (HOCl, 250 мкМ), которую получали путём разведения коммерческого раствора NaOCl в ФСБ. Концентрацию HOCl в разведённом коммерческом растворе NaOCl определяли спектрофотометрически, используя молярный коэффициент поглощения  $350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  на длине волны 290 нм при pH 12,0 [16]. Поскольку при физиологических значениях pH HOCl ( $\text{pK}_a=7,5$ ) находится как в молекулярной форме, так и в качестве аниона, в данной работе под HOCl будем понимать смесь OCl<sup>-</sup> и HOCl. После завершения инкубации образцы разводили в 3 раза ФСБ, содержащим 1 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 0,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , и анализировали на проточном цитометре CytoFocus 820 ("Healcom", Китай). Для каждого из образцов анализировали не менее 20000 одиночных клеток. Популяцию нейтрофилов определяли по соотношению показателей прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния. Для возбуждения флуоресценции PI использовали лазер с длиной волны 488 нм, для регистрации — фильтр  $620 \pm 20$  нм (ECD канал). В качестве количественного параметра, характеризующего жизнеспособность нейтрофилов, использовали процент PI-положительных клеток в популяции нейтрофилов, который определяли при помощи прилагаемого к проточному цитометру программного обеспечения.

Жизнеспособность нейтрофилов, проинкубированных с нативными или гибридными СС, определяли также по активности лактатдегидрогеназы

(ЛДГ) в надосадочной жидкости нейтрофилов с помощью коммерческого набора ЛДГ-2-ОЛЬВЕКС. Для этого к 1 мл рабочего реагента добавляли 10 мкл надосадочной жидкости нейтрофилов и регистрировали оптическую плотность раствора при длине волны 340 нм с интервалом в 1 мин в течение 3 мин с помощью спектрофотометра РВ 2201 ("СОЛАР", Беларусь). Далее рассчитывали среднее значение скорости изменения оптической плотности за 1 мин ( $\Delta D_{340}/\text{мин}$ ).

#### Регистрация продукции АФК нейтрофилами

Внеклеточную продукцию  $\text{H}_2\text{O}_2$  нейтрофилами оценивали флуоресцентным методом с использованием системы скополетин-пероксидаза хрена [16]. К суспензии нейтрофилов ( $1 \times 10^6$  кл/мл) в ФСБ, содержащем 1 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 0,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , добавляли скополетин (флуоресцентный субстрат пероксидазы хрена, 1 мкМ), пероксидазу хрена (20 мкг/мл),  $\text{NaN}_3$  (ингибитор каталазы и МПО, 1 мМ) и нативные или гибридные СС, или полисахариды в концентрации 0,25 мг/мл. В серии экспериментов до внесения СС нейтрофилы инкубировали в течение 5 мин при 37°C с ингибиторами (DPI (20 мкМ), PP2 (100 мкМ), вортманнин (100 нМ), cyt b (5 мкМ),  $\text{NiCl}_2$  (1 мМ), метоксиверапамил (100 мкМ), U73122 (620 нМ)). Снижение интенсивности флуоресценции скополетина регистрировали на длине волны 460 нм (при возбуждении флуоресценции на длине волны 350 нм) с помощью компьютеризированного спектрофлуориметра CM 2203 ("СОЛАР"). Для количественной характеристики внеклеточной продукции нейтрофилами  $\text{H}_2\text{O}_2$  рассчитывали максимальный наклон зарегистрированных кинетических кривых снижения интенсивности флуоресценции скополетина.

Внутриклеточную продукцию АФК нейтрофилами изучали методом проточной цитометрии с использованием  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , который позволяет оценить общий уровень окислителей внутри клетки [17]. Нейтрофилы ( $1 \times 10^6$  кл/мл) в ФСБ, содержащем 1 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 0,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , инкубировали с  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (2,5 мкМ) в течение 10 мин при комнатной температуре, а затем добавляли нативные или гибридные СС (0,25 мг/мл), полисахариды (0,25 мг/мл) или РМА (50 нМ) (в качестве положительного контроля) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. В серии экспериментов перед добавлением СС нейтрофилы инкубировали в течение 5 мин при 37°C с ингибиторами (DPI (20 мкМ), PP2 (100 мкМ), вортманнин (100 нМ), cyt b (5 мкМ),  $\text{NiCl}_2$  (1 мМ), метоксиверапамил (100 мкМ), U73122 (620 нМ)). Далее клеточную суспензию разбавляли в 3 раза ФСБ, содержащим 1 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 0,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , и анализировали на проточном цитометре CytoFocus 820. Для каждого из образцов анализировали не менее 20000 одиночных клеток. Популяцию нейтрофилов определяли по соотношению FSC и SSC. Для возбуждения флуоресценции 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина (DCF) использовали лазер с длиной волны 488 нм, для регистрации —

фильтр 525±40 нм (FITC канал). В качестве количественного параметра, характеризующего внутриклеточную продукцию АФК нейтрофилами, использовали медиану интенсивности флуоресценции DCF в популяции DCF-положительных нейтрофилов, которую определяли при помощи прилагаемого к проточному цитометру программного обеспечения.

*Определение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция в нейтрофилах*

Внутриклеточную концентрацию свободных ионов кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) в нейтрофилах определяли с применением флуоресцентного зонда фура-2АМ, как было описано ранее [18]. К 1 мл ( $10^7$  кл/мл) отмытых нейтрофилов в 20 мМ HEPES-буфере (рН 7,4), содержащем 120 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 1,2 мМ  $KH_2PO_4$ , 4,4 мМ  $MgSO_4$ , 1,7 мМ  $CaCl_2$  и 11 мМ D-глюкозы, добавляли 2 мкл фура-2АМ (0,5 мМ) и инкубировали в течение 40 мин при 37°C и постоянном перемешивании. Нагруженные зондом клетки отмывали дважды от инкубационной среды HEPES-буфером без  $CaCl_2$  при 400 g в течение 5 мин. Отмытые нейтрофилы сохраняли в качестве исходной суспензии в концентрации  $10^7$  кл/мл. Для измерения  $[Ca^{2+}]_i$  в кювету спектрофлуориметра вносили 0,9 мл HEPES-буфера и 100 мкл исходной суспензии клеток, а затем добавляли СС в различных концентрациях. Измерение интенсивности флуоресценции проводили на длине волны 510 нм (возбуждение флуоресценции — 340 нм и 380 нм) при 37°C в кинетическом режиме с использованием компьютеризированного спектрофлуориметра CM 2203.  $[Ca^{2+}]_i$  в нейтрофилах рассчитывали, как описано ранее [19], используя метод ратиометрической калибровки.

*Исследование морфологических характеристик нейтрофилов*

Анализ морфологических характеристик нейтрофилов проводили методом проточной цитометрии [20]. Нейтрофилы инкубировали с нативными или гибридными СС (0,25 мг/мл) в ФСБ, содержащем 1 мМ  $CaCl_2$  и 0,5 мМ  $MgCl_2$ , 1 ч при 37°C. Образцы, проинкубированные с тестируемыми препаратами, анализировали по процентному содержанию клеток с большей величиной SSC (площадь импульса), чем пороговое значение, определённое в образце без СС (процент положительных событий <10%).

Для исследования изменений в организации актинового цитоскелета нейтрофилов, проинкубированных с СС, использовали конфокальную микроскопию, как описано ранее [16]. Нейтрофилы ( $3 \times 10^6$  кл/мл) в ФСБ, содержащем 1 мМ  $CaCl_2$  и 0,5 мМ  $MgCl_2$ , инкубировали с или без СС (0,25 мг/мл) в течение 15 мин при 37°C; затем клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего образцы отмывали от фиксатора дважды путём центрифугирования при 450 g в течение 5 мин и ресуспендирования осадка в ФСБ. Отмытые нейтрофилы наносили на покровные

стёкла, предварительно покрытые поли-L-лизинном в течение 1 ч. После прикрепления клеток к стёклам образцы промывали 3 раза ФСБ. Далее покровные стёкла с нейтрофилами инкубировали в течение 5 мин с 0,1% тритоном X-100 для пермеабилзации мембран, затем образцы отмывали 3 раза ФСБ. Далее покровные стёкла с нейтрофилами инкубировали в темноте в течение 40 мин при комнатной температуре с фаллоидином (0,165 мкМ), конъюгированным Alexa Fluor 488, после чего стёкла отмывали от избытка флуоресцентно меченого зонда ФСБ (2 раза по 10 мин) и дистиллированной водой (1 раз 10 мин). Покровные стёкла с нейтрофилами закрепляли на предметных стёклах, предварительно обезжиренных 96% спиртом, с использованием водной монтажной среды Fluoromount. Полученные образцы анализировали с помощью спектрально-аналитического комплекса на основе сканирующего конфокального микроскопа Nanofinder ("Tokio Instruments" Япония). Возбуждение флуоресценции красителя Alexa Fluor 488 осуществляли лазером с длиной волны 488 нм, детекцию флуоресценции — фильтром 505–550 нм. Результаты экспериментов были обработаны с использованием программного обеспечения "NanoFinder Data Viewer".

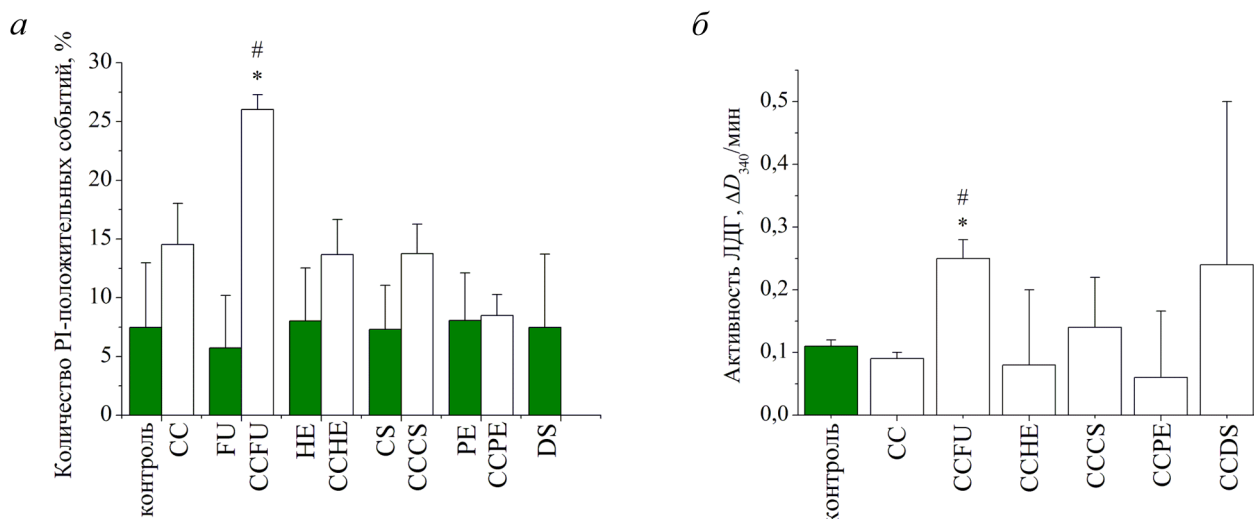
*Статистическая обработка данных*

Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего значения ( $M \pm SEM$ ). Минимальное количество независимых экспериментов, проводимых для каждой экспериментальной точки, — 5–7 при отсутствии других указаний. Достоверность различий средних рассчитывали с применением *t*-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Кинетические кривые представлены как типичные для серии из 5–7 независимых экспериментов. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного пакета Origin 7.0 ("OriginLab Corporation", США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Оценка цитотоксичности микрочастиц ватерита и полисахаридов*

Жизнеспособность нейтрофилов в присутствии полисахаридов, нативных или гибридных СС была оценена методом проточной цитометрии с использованием связывающегося с нуклеиновыми кислотами PI, который не проникает в живые клетки и обычно используется для обнаружения мёртвых клеток в популяции. Как видно из данных, представленных на рисунке 1а, ни один из используемых полисахаридов (0,25 мг/мл, 1 ч при 37°C) не нарушал целостность плазматической мембраны нейтрофилов. При исследовании влияния на жизнеспособность нейтрофилов нативных и гибридных СС (0,25 мг/мл, 1 ч при 37°C) лишь после инкубации нейтрофилов с ССFU количество нежизнеспособных клеток увеличивалось примерно в 2 раза по сравнению с контролем. Необходимо отметить, что цитометрический метод с PI нельзя было



**Рисунок 1.** Влияние нативных и гибридных СС (0,25 мг/мл) (**а** (тест с PI) и **б** (тест с ЛДГ)) и полисахаридов (0,25 мг/мл) (**а** (тест с PI)) на жизнеспособность нейтрофилов. Нейтрофилы инкубировали с тестируемыми препаратами в течение 1 ч при 37°C. \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем. # $p < 0,05$  по сравнению с эффектом СС.

применить для оценки влияния на жизнеспособность нейтрофилов CCDS в связи с интеркаляцией в них PI, что приводило к одновременному окрашиванию и нейтрофилов и CCDS (данные не представлены). Поэтому дополнительно для оценки жизнеспособности нейтрофилов был использован спектрофотометрический метод по измерению активности ЛДГ во внеклеточной среде. После инкубации нейтрофилов с CCFU активность ЛДГ во внеклеточной среде достоверно увеличивалась, что свидетельствует о нарушении жизнеспособности нейтрофилов и согласуется с результатами теста с PI. После инкубации нейтрофилов с CCDS была отмечена тенденция к увеличению активности ЛДГ во внеклеточной среде, однако достоверных различий выявлено не было (рис. 1б).

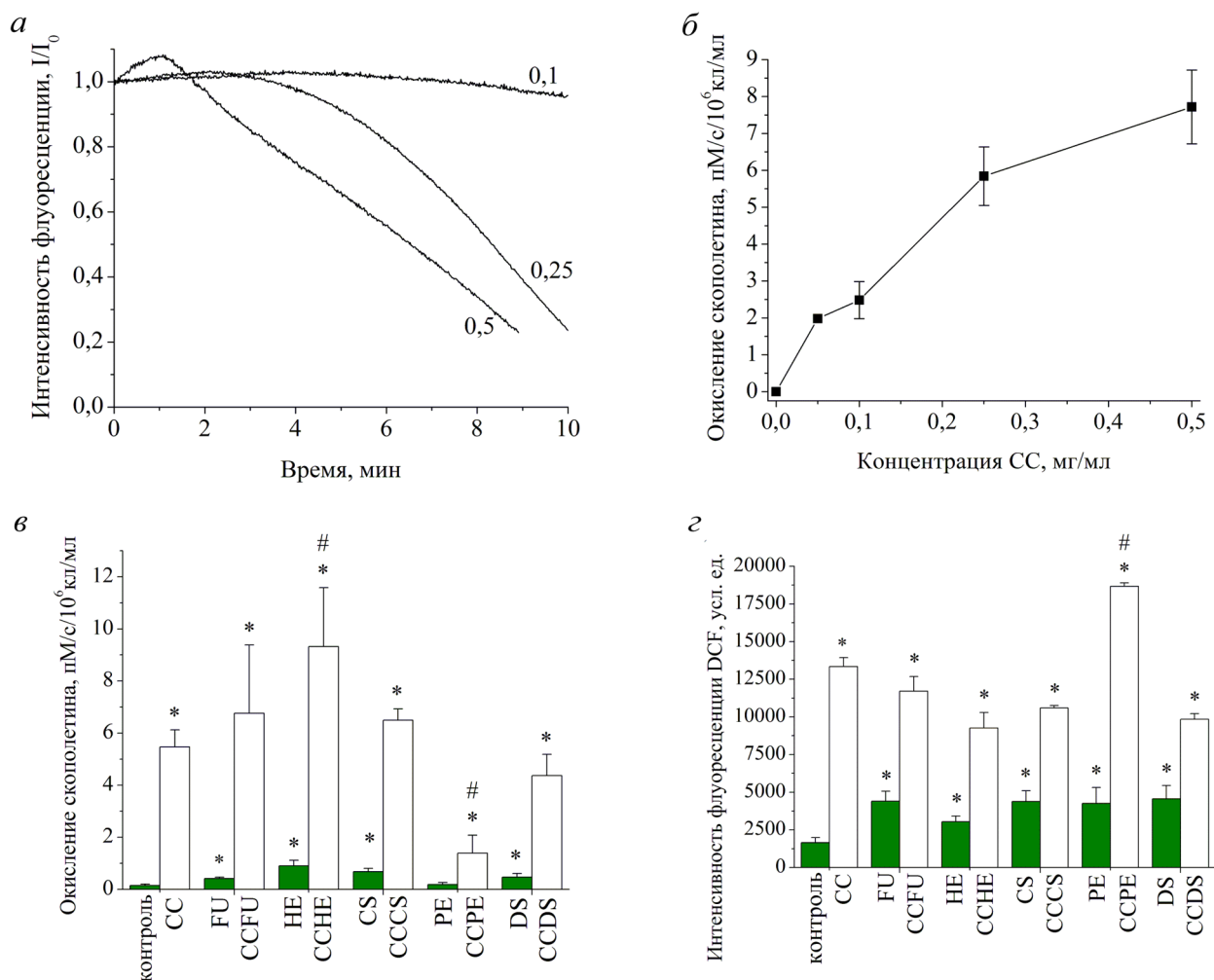
#### *Продукция АФК нейтрофилами при действии микрочастиц ватерита и полисахаридов*

Продукцию АФК нейтрофилами при действии нативных и гибридных СС, а также полисахаридов исследовали двумя способами: флуоресцентным методом с использованием скополетина, который регистрирует внеклеточную продукцию  $H_2O_2$ , и методом проточной цитометрии с использованием  $H_2DCFDA$ , который регистрирует преимущественно внутриклеточную продукцию различных АФК. На рисунке 2а приведены типичные кинетические кривые окисления скополетина в суспензии нейтрофилов, активированных нативными СС в различных концентрациях. Видно, что СС инициируют дозо-зависимую (рис. 2а,б) продукцию  $H_2O_2$  нейтрофилами, что согласуется с данными литературы [21, 22]. Как показано на рисунке 2в, добавление гибридных СС к нейтрофилам также сопровождалось активацией клеток. Следует при этом отметить, что эффект ССНЕ на продукцию  $H_2O_2$  (скополетинный тест) был выше по сравнению с эффектом нативных СС, а в присутствии ССРЕ,

наоборот, активация респираторного взрыва нейтрофилов была ниже (рис. 2в) по сравнению с эффектом СС.

Как видно из данных, представленных на рисунке 2в, в присутствии HE, так же, как и при действии FU, DS или CS была зарегистрирована продукция  $H_2O_2$  нейтрофилами, однако эффекты данных полисахаридов были меньше по сравнению с эффектами нативных и гибридных СС. Сравнительный анализ влияния нативных и гибридных СС на активность нейтрофилов показал, что включение в состав СС полисахаридов приводит к изменению свойств СС таким образом, что активация нейтрофилов усиливается (в случае включения в состав СС HE) или уменьшается (в случае включения в состав СС PE), то есть эффект гибридных СС не является аддитивным (суммированием эффектов СС и полисахаридов).

Активация NADPH-оксидазы нейтрофилов при действии полисахаридов, а также нативных и гибридных СС была исследована методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентного зонда  $H_2DCFDA$ , позволяющего оценить внутриклеточную продукцию АФК в клетках [16]. Как видно из данных, представленных на рисунке 2г, после инкубации с нативными СС интенсивность флуоресценции DCF в нейтрофилах увеличивалась. Однако необходимо отметить, что эффект самих СС был на порядок меньше, чем эффект стандартного активатора нейтрофилов — форболового эфира PMA (данные не представлены). При проведении сравнительного анализа влияния гибридных СС на внутриклеточную продукцию АФК нейтрофилами было выявлено, что эффекты гибридных СС сопоставимы с эффектами самих СС, за исключением ССРЕ, в присутствии которых интенсивность флуоресценции DCF была достоверно выше по сравнению с эффектом СС (рис. 2г). При исследовании влияния самих полисахаридов на внутриклеточную продукцию АФК



**Рисунок 2.** Влияние нативных и гибридных СС, а также полисахаридов на продукцию АФК нейтрофилами. **а** – типичные кинетические кривые окисления скополетина в суспензии нейтрофилов после добавления СС в концентрации 0,1 мг/мл; 0,25 мг/мл; 0,5 мг/мл; **б** – зависимость скорости окисления скополетина от концентрации СС; **в** и **г** – влияние нативных и гибридных СС (0,25 мг/мл), а также полисахаридов (0,25 мг/мл) на внеклеточную (**в**) и внутриклеточную (**г**) продукцию АФК нейтрофилами. Используемые концентрации СС на панели **а** указаны числами рядом с кривыми в мг/мл. \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем. # $p < 0,05$  по сравнению с эффектом нативных СС.

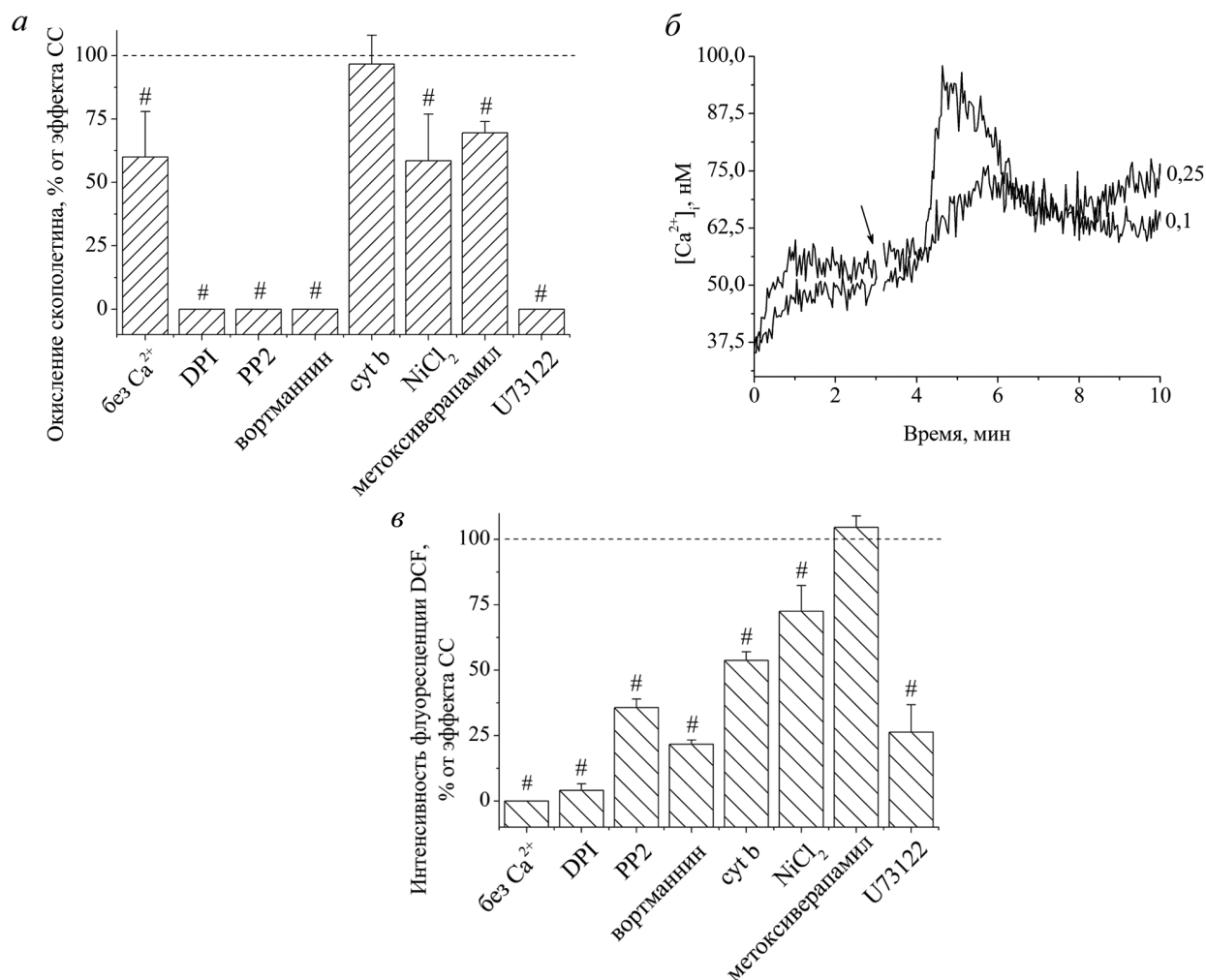
нейтрофилами было выявлено, что все используемые полисахариды вызывают небольшую внутриклеточную продукцию АФК (рис. 2г), однако эффекты полисахаридов выражены значительно слабее по сравнению с эффектами СС.

Активация продукции  $H_2O_2$  нейтрофилами при действии СС снижалась при наличии в среде инкубации DPI — ингибитора сборки NADPH-оксидазы, что указывает на активацию респираторного взрыва нейтрофилов (рис. 3а). Кроме того, торможение СС-индуцированной продукции  $H_2O_2$  нейтрофилами наблюдалось в присутствии PP2 — ингибитора нерецепторных цитозольных тирозинкиназ семейства Src (Lck, Fyn и Hck), вортманнина — селективного и необратимого ингибитора PI3K и U73122 — ингибитора PLC (рис. 3а), что указывает на участие данных сигнальных молекул в респираторном взрыве нейтрофилов в ответ на СС. Cyt b, ингибирующий полимеризацию актина, не влиял на внеклеточную продукцию  $H_2O_2$  нейтрофилами в ответ на СС.

В ответ на СС в бескальциевой среде было отмечено некоторое снижение скорости окисления скополетина (рис. 3а). Кроме того, при использовании  $NiCl_2$ , неорганического блокатора  $Ca^{2+}$ -каналов Т-типа, или метоксиферапамила, ингибитора потенциал-зависимых  $Ca^{2+}$ -каналов L-типа, СС-индуцированная продукция  $H_2O_2$  нейтрофилами снижалась на 20–60% (рис. 3а).

Эти данные свидетельствуют о вовлечённости  $Ca^{2+}$  в сигнальные процессы, приводящие к активации респираторного взрыва нейтрофилов в ответ на СС. Действительно, как показано на рисунке 3б, добавление СС к суспензии нейтрофилов приводило к дозо-зависимому увеличению  $[Ca^{2+}]_i$ , которое снижалось на 57% в присутствии  $NiCl_2$  и на 48% в присутствии метоксиферапамила, указывая на роль  $Ca^{2+}$ -каналов плазматической мембраны в СС-индуцированном увеличении  $[Ca^{2+}]_i$  в нейтрофилах. Следует отметить, что увеличение входа  $Ca^{2+}$  в цитозоль нейтрофилов не обусловлено увеличением концентрации  $Ca^{2+}$  во внеклеточной среде





**Рисунок 3.** Влияние ингибиторов на внеклеточную продукцию  $\text{H}_2\text{O}_2$  нейтрофилами (**а**), изменение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах (**б**), внутриклеточную продукцию АФК нейтрофилами (**в**) при действии СС. Используемые концентрации: СС – 0,25 мг/мл, DPI – 20 мкМ, PP2 – 100 мкМ, вортманнин – 100 нМ, сут b – 5 мкМ,  $\text{NiCl}_2$  – 1 мМ, метоксиверапамил – 100 мкМ, U73122 – 620 нМ. Используемые концентрации СС на панели **б** указаны числами рядом с кривыми в мг/мл, стрелкой отмечен момент добавления СС.  $\#p < 0,05$  по сравнению с эффектом СС.

из-за растворения СС, поскольку, при инкубации СС в буферных растворах (ФСБ или HEPES-буфер) в течение 1 ч количество высвобождаемых  $\text{Ca}^{2+}$  составляет 6–15 нМ на 0,1–0,25 мг СС.

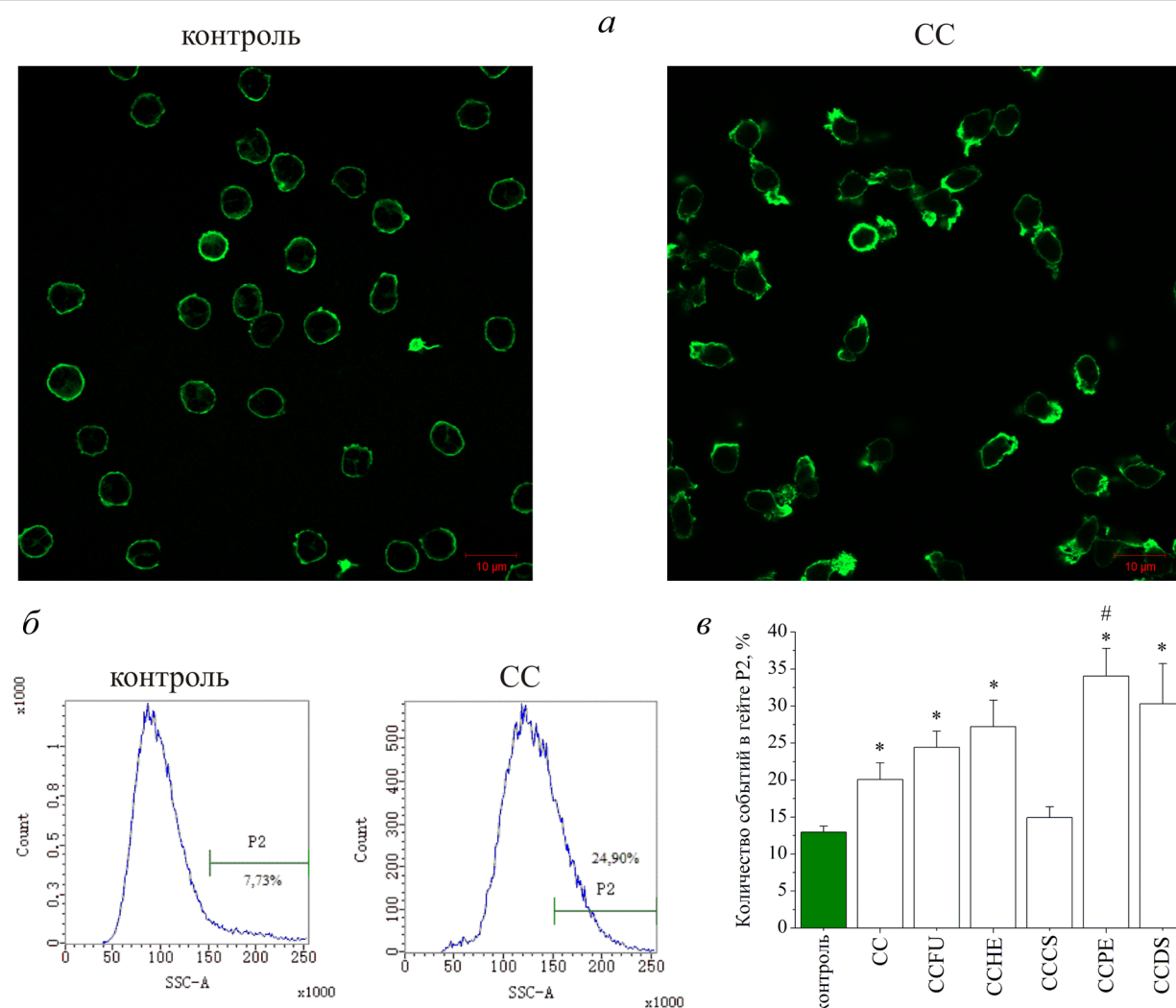
Далее был проведен ингибиторный анализ внутриклеточной продукции АФК нейтрофилами после взаимодействия с СС. Как видно из данных, представленных на рисунке 3в, внутриклеточная продукция АФК нейтрофилами в ответ на СС снижалась в бескальциевой среде, в присутствии DPI, PP2, вортманнина,  $\text{NiCl}_2$ , U73122, а также в присутствии сут b, нарушающего внутриклеточную динамику актина.

#### Анализ морфологических характеристик нейтрофилов в присутствии микрочастиц ватерита

Взаимодействие СС с нейтрофилами может сопровождаться изменением морфологии клеток в результате запуска внутриклеточных сигнальных процессов и реорганизации актинового цитоскелета [23]. Далее методом конфокальной микроскопии была исследована организация

актинового цитоскелета нейтрофилов при действии СС. Как видно из данных, представленных на рисунке 4а, в контрольных клетках ярко выражен кортикальный цитоскелет (по краям клеток) и менее интенсивно выражено распределение F-актина (цитозольный цитоскелет) по всей клетке; после инкубации нейтрофилов с СС наблюдается образование псевдоподий различной формы, что свидетельствует о реорганизации актинового цитоскелета.

Метод проточной цитометрии позволяет определить широкий спектр параметров: объем и морфологическую структуру клеток, состояние мембраны, поверхностные и внутриклеточные клеточные маркеры и т.д. Величина FSC зависит от объема клетки, в то время как значение SSC, связанное с такими клеточными параметрами как форма ядра, количество и тип цитоплазматических гранул и шероховатость мембран, зависит от морфологии клетки. Известно, что в процессе активации клетки и изменения её морфологии величина SSC возрастает [22, 24]. На рисунке 4б представлено распределение популяции контрольных



**Рисунок 4.** Влияние нативных и гибридных СС на морфологические характеристики нейтрофилов: **а** – организация актинового цитоскелета в контрольных клетках и в нейтрофилах, проинкубированных с СС (0,25 мг/мл); **б** – распределение контрольных клеток и нейтрофилов, проинкубированных с СС (0,25 мг/мл), по величине SSC; **в** – количество нейтрофилов в гейте P2 в контроле, а также после инкубации с нативными или гибридными СС (0,25 мг/мл). \* $p < 0,05$  по сравнению с контролем. # $p < 0,05$  по сравнению с эффектом нативных СС. Масштабная линейка на панели **а** – 10 мкм.

клеток и нейтрофилов, проинкубированных с СС (0,25 мг/мл, 1 ч при 37°C) по величине SSC. Видно, что после инкубации нейтрофилов с СС количество клеток, характеризующихся большими значениями SSC, увеличивалось, что может быть обусловлено адсорбцией и/или поглощением СС [25]. В присутствии всех гибридных СС, за исключением CCCS, морфологические характеристики нейтрофилов изменялись (рис. 4в). Однако наибольшие изменения значения SSC регистрировались при действии CCPE, которые также оказывали наибольший активирующий эффект на внутриклеточную продукцию АФК (тест с  $H_2DCFDA$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были получены и охарактеризованы гибридные СС с полисахаридами (FU, HE, CS, PE, DS) для увеличения их стабильности в биологических системах и эффективного включения в их состав

целевых молекул для разработки средств доставки лекарственных препаратов [3, 4].

Для предполагаемого применения СС в качестве специфической транспортной системы биологически активных молекул решающую роль играет биосовместимость. Оказалось, что CCDS, CCCS, CCHE и CCPE не проявляют цитотоксичность по отношению к нейтрофилам, которые представляют собой ключевое звено врожденного иммунитета (рис. 1а,б). Среди протестированных гибридных СС только CCFU оказывали небольшое цитотоксическое действие (рис. 1). Сам по себе FU не нарушал целостность мембраны нейтрофилов (рис. 1а), что согласуется с данными работы [26], в которой было показано, что FU не влияет на жизнеспособность опухолевых и неопухолевых клеточных линий.

При исследовании влияния СС на респираторный взрыв нейтрофилов оказалось, что сами по себе СС способны активировать NADPH-оксидазу нейтрофилов (тест с  $H_2DCFDA$  и со скополетином). Продукция АФК



нейтрофилами снижалась в присутствии DPI — ингибитора сборки NADPH-оксидазы, а также в присутствии ингибиторов нерецепторных тирозинкиназ семейства Src, PI3K и PLC (рис. 3а,в). Продукция АФК нейтрофилами при действии СС снижалась в присутствии блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов Т-типа  $\text{NiCl}_2$ . Кроме того, тест со скополетином выявил снижение продукции АФК нейтрофилами при действии СС в присутствии метоксиверапамила — блокатора  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа. Флуоресцентным методом с применением фура-2АМ было выявлено увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах. Ранее была показана способность другого изоформа  $\text{CaCO}_3$  (арагонита) повышать  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в клетках [27].

Тест с  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  показал, что активация NADPH-оксидазы в мембране эндо/фагосом в ответ на СС снижалась также в присутствии  $\text{cyt b}$  — ингибитора реорганизации актинового цитоскелета (рис. 3в). Возможно, СС, размеры которых превышают 1 мкм, могут поглощаться нейтрофилами путём макропиноцитоза [23]. Так, активация нейтрофилов при действии СС сопровождалась также полимеризацией актина с образованием филоподий у одного края клетки (рис. 4а), что является одним из этапов инвагинации плазматической мембраны и образования везикул [28]. Кроме того, после инкубации нейтрофилов с СС увеличивалось количество клеток, имеющих большую величину SSC (рис. 4б,в), (т.е. имеющих более высокие рассеивающие свойства), что свидетельствует об изменении морфологии нейтрофилов в результате активации процессов реорганизации цитоскелета и возможном захвате СС клетками [25]. Однако для подтверждения проникновения СС в нейтрофилы необходимы дополнительные исследования.

Подобно нативным СС, гибридные СС также инициировали продукцию АФК нейтрофилами. Следует, однако, отметить, что в отличие от нативных СС, эффект ССНЕ на генерацию  $\text{H}_2\text{O}_2$  в тесте со скополетином был выше, а ССРЕ — ниже. При исследовании влияния гибридных СС на продукцию АФК внутри клеток (тест с  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) было выявлено, что ССРЕ оказывают наибольший стимулирующий эффект. Как и в случае с нативными СС, после добавления всех исследованных гибридных СС, за исключением ССДС, было отмечено увеличение количества нейтрофилов, характеризующихся большими значениями величины SSC, что свидетельствует об изменении морфологических характеристик клеток. Количество нейтрофилов, характеризующихся большими значениями SSC, было выявлено в образце, проинкубированном с ССРЕ, при действии которых была зарегистрирована наиболее сильная внутриклеточная продукция АФК.

Различия в действии гибридных СС на активацию нейтрофилов могут быть обусловлены вкладом разных по природе полисахаридов, входящих в их состав. Так, при действии всех полисахаридов, за исключением РЕ, было выявлено небольшое, однако достоверное увеличение скорости окисления скополетина. Что касается продукции АФК внутри

клеток, которую регистрировали с применением  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , то её достоверное увеличение было отмечено при действии всех полисахаридов. Согласно данным литературы [29, 30], полисахариды могут связываться с т.н. образ-распознающими рецепторами (паттерн-рецепторами) и запускать внутриклеточные сигнальные каскады, опосредующие функциональные ответы клеток. Известна, например, иммуномодулирующая активность FU: задержка апоптоза нейтрофилов и индукция выработки ими провоспалительных цитокинов [31, 32], усиление  $\text{TNF-}\alpha$ -индуцированного образования НВЛ [33], праймирование респираторного взрыва фагоцитов [34], усиление фагоцитарной активности макрофагов [35]. При действии НЕ выявляется стимуляция продукции АФК нейтрофилами [36] и моноцитами [37]. Показано связывание НЕ с изолированными нейтрофилами и стимуляция выхода из клеток МПО [38]. Нейтрофилы, выделенные из крови, стабилизированной НЕ, характеризовались увеличенной  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  и усиленной активацией в ответ на РМА [39]. При действии РЕ регистрируется усиление миграции нейтрофилов, повышение их фагоцитарной активности и образование АФК в этих клетках [40, 41].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Включение биополимеров в СС не только изменяет физико-химические свойства самих СС [2–6], но и позволяет модулировать функции нейтрофилов. Гибридные СС, способные усиливать продукцию АФК в цитозоле нейтрофилов (например, ССНЕ), могут быть использованы для разработки на их основе средств доставки антибактериальных и противовирусных препаратов, что может усиливать их действие за счёт дополнительной активации нейтрофилов. С другой стороны, ССРЕ представляют интерес для доставки лекарственных средств в воспалённые ткани без высвобождения АФК во внеклеточное пространство.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке совместного гранта Российского научного фонда (проект № 23-45-10026) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № Б23РНФ-093). Получение микрочастиц ватерита проведено при частичной поддержке темы 121041500039-8 МГУ имени М.В. Ломоносова. Исследование влияния микрочастиц ватерита на жизнеспособность нейтрофилов было поддержано грантом Министерства образования Республики Беларусь (договор № 002/2024-БГУ).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и её последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включённых в исследование участников было получено информированное добровольное согласие. Данное исследование было одобрено решением этического комитета ГУ “РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий” (решение № 1 от 10.04.2022 г., Минск, Беларусь).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ferreira A.M., Vikulina A.S., Volodkin D. (2020) CaCO<sub>3</sub> crystals as versatile carriers for controlled delivery of antimicrobials. *J. Control. Release*, **328**, 470–489. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.08.061
2. Balabushevich N.G., Kovalenko E.A., Mikhalechik E.V., Filatova L.Y., Volodkin D., Vikulina A.S. (2019) Mucin adsorption on vaterite CaCO<sub>3</sub> microcrystals for the prediction of mucoadhesive properties. *J. Colloid Interface Sci.*, **545**, 330–339. DOI: 10.1016/j.jcis.2019.03.042
3. Balabushevich N.G., Maltseva L.N., Filatova L.Y., Mosieievich D.V., Mishin P.I., Bogomiakova M.E., Lebedeva O.S., Murina M.A., Klinov D.V., Obratsova E.A., Kharaeva Z.F., Firova R.K., Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Panasenکو O.M., Mikhalechik E.V. (2024) Influence of natural polysaccharides on the morphology and properties of hybrid vaterite microcrystals. *Heliyon*, **10**(13), e33801. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e33801
4. Григорьева Д.В., Михальчик Е.В., Балабушевич Н.Г., Мосиевич Д.В., Мурина М.А., Панасенко О.М., Соколов А.В., Горудко И.В. (2024) Влияние биополимеров и функционализированных ими микрочастиц ватерита на агрегацию тромбоцитов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, **110**(6), 1020–1036. DOI: 10.31857/S0869813924060107 [Grigorieva D.V., Mikhalechik E.V., Balabushevich N.G., Mosieievich D.V., Murina M.A., Panasenکو O.M., Sokolov A.V., Gorudko I.V. (2024) Effect of biopolymers and functionalized by them vaterite microparticles on platelet aggregation. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **60**(3), 1221–1233.] DOI: 10.1134/S0022093024030281
5. Balabushevich N.G., Kovalenko E.A., Le-Deygen I.M., Filatova L.Y., Volodkin D., Vikulina A.S. (2019) Hybrid CaCO<sub>3</sub>-mucin crystals: effective approach for loading and controlled release of cationic drugs. *Materials Design*, **182**, 108020. DOI: 10.1016/j.matdes.2019.108020
6. Галямина М.А., Побегуц О.В., Фирова Р.Х., Мосиевич Д.В., Хараева З.Ф., Панасенко О.М., Балабушевич Н.Г., Михальчик Е.В. (2024) Биологическая активность гибридных микрочастиц ватерит-пектин в отношении бактерий *E. coli* и нейтрофилов человека. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **177**(2), 209–214. DOI: 10.47056/0365-9615-2024-177-2-209-214 [Galyamina M.A., Pobeguts O.V., Firova R.K., Mosieievich D.V., Kharaeva Z.F., Panasenکو O.M., Balabushevich N.G., Mikhalechik E.V. (2024) Biological activity of hybrid vaterite-pectin microparticles towards bacteria *E. coli* and human neutrophils. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **177**(2), 238–242.] DOI: 10.1007/s10517-024-06164-2
7. Campbell J., Ferreira A.M., Bowker L., Hunt J., Volodkin D., Vikulina A. (2022) Dextran and its derivatives: biopolymer additives for the modulation of vaterite CaCO<sub>3</sub> crystal morphology and adhesion to cells. *Adv. Mater. Interfaces*, **9**(31), 1–10. DOI: 10.1002/admi.202201196
8. Gusliakova O., Verkhovskii R., Abalymov A., Lengert E., Kozlova A., Atkin V., Nechaeva O., Morrison A., Tuchin V., Svenskaya Y. (2021) Transdermal platform for the delivery of the antifungal drug naftifine hydrochloride based on porous vaterite particles. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, **119**, 111428. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111428
9. Feoktistova N.A., Balabushevich N.G., Skirtach A.G., Volodkin D., Vikulina A.S. (2020) Inter-protein interactions govern protein loading into porous vaterite CaCO<sub>3</sub> crystals. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **22**(17), 9713–9722. DOI: 10.1039/d0cp00404a
10. Kim A.L., Dubrovskii A.V., Musin E.V., Tikhonenko S.A. (2023) Determination of phenol with peroxidase immobilized on CaCO<sub>3</sub>. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(7), 6766. DOI: 10.3390/ijms24076766
11. Zhao P., Tian Y., Lu Y., Zhang J., Tao A., Xiang G., Liu Y. (2022) Biomimetic calcium carbonate nanoparticles delivered IL-12 mRNA for targeted glioblastoma sono-immunotherapy by ultrasound-induced necroptosis. *J. Nanobiotechnol.*, **20**(1), 525. DOI: 10.1186/s12951-022-01731-z
12. Ferreira A.M., Vikulina A.S., Bowker L., Hunt J.A., Loughlin M., Puddu V., Volodkin D. (2024) Nanoarchitectonics of bactericidal coatings based on CaCO<sub>3</sub>-nanosilver hybrids. *ACS Appl. Bio Mater.*, **7**(5), 2872–2886. DOI: 10.1021/acsabm.3c01228
13. Mikhalechik E.V., Basyreva L.Y., Gusev S.A., Panasenکو O.M., Klinov D.V., Barinov N.A., Morozova O.V., Moscalets A.P., Maltseva L.N., Filatova L.Y., Pronkin E.A., Bespyatykh J.A., Balabushevich N.G. (2022) Activation of neutrophils by mucin-vaterite microparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(18), 10579. DOI: 10.3390/ijms231810579
14. Mikhalechik E.V., Maltseva L.N., Firova R.K., Murina M.A., Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Ivanov V.A., Obratsova E.A., Klinov D.V., Shmeleva E.V., Gusev S.A., Panasenکو O.M., Sokolov A.V., Gorbunov N.P., Filatova L.Y., Balabushevich N.G. (2023) Incorporation of pectin into vaterite microparticles prevented effects of adsorbed mucin on neutrophil activation. *Int. J. Mol. Sci.*, **24**(21), 15927. DOI: 10.3390/ijms242115927
15. Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Grudinina N.A., Panasenکو O.M., Semak I.V., Sokolov A.V., Timoshenko A.V. (2022) Lactoferrin modified by hypohalous acids: partial loss in activation of human neutrophils. *Int. J. Biol. Macromol.*, **195**, 30–40. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.165
16. Gorudko I.V., Grigorieva D.V., Shamova E.V., Kostevich V.A., Sokolov A.V., Mikhalechik E.V., Cherenkevich S.N., Arnhold J., Panasenکو O.M. (2014) Hypohalous acid-modified human serum albumin induces neutrophil NADPH oxidase activation, degranulation, and shape change. *Free Radic. Biol. Med.*, **68**, 326–334. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.12.023
17. Oparka M., Walczak J., Malinska D., van Oppen L.M.P.E., Szczepanowska J., Koopman W.J.H., Wieckowski M.R. (2016) Quantifying ROS levels using CM-H<sub>2</sub>DCFDA and HyPer. *Methods*, **109**, 3–11. DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.06.008
18. Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Shamova E.V., Terekhova M.S., Maliushkova E.V., Semak I.V., Cherenkevich S.N., Sokolov A.V., Timoshenko A.V. (2019) Effects of recombinant human lactoferrin on calcium signaling and functional responses of human neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.*, **675**, 108122. DOI: 10.1016/j.abb.2019.108122

19. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien R.Y. (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**(6), 3440–3450.
20. Renò F, Carniato F, Rizzi M, Olivero F, Pittarella P, Marchese L. (2013) Flow cytometry evidence of human granulocytes interaction with polyhedral oligomeric silsesquioxanes: effect of nanoparticle charge. *Nanotechnology*, **24**(18), 185101. DOI: 10.1088/0957-4484/24/18/185101
21. Burt H.M., Jackson J.K., Taylor D.R., Crowther R.S. (1997) Activation of human neutrophils by calcium carbonate polymorphs. *Dig. Dis. Sci.*, **42**(6), 1283–1289. DOI: 10.1023/a:1018870511257
22. Pang L., Hayes C.P., Buac K., Yoo D.G., Rada B. (2013) Pseudogout-associated inflammatory calcium pyrophosphate dihydrate microcrystals induce formation of neutrophil extracellular traps. *J. Immunol.*, **190**(12), 6488–6500. DOI: 10.4049/jimmunol.1203215
23. Iversen T.-G., Skotland T., Sandvig K. (2011) Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, **6**, 176–185. DOI: 10.1016/j.nantod.2011.02.003
24. Schorn C., Janko C., Latzko M., Chaurio R., Schett G., Herrmann M. (2012) Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front. Immunol.*, **3**, 277. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00277
25. Parakhonskiy B., Zyuzin M.V., Yashchenok A., Carregal-Romero S., Rejman J., Möhwald H., Parak W.J., Skirtach A.G. (2015) The influence of the size and aspect ratio of anisotropic, porous  $\text{CaCO}_3$  particles on their uptake by cells. *J. Nanobiotechnol.*, **13**, 53. DOI: 10.1186/s12951-015-0111-7
26. Bittkau K.S., Dörschmann P., Blümel M., Tasdemir D., Roeder J., Klettner A., Alban S. (2019) Comparison of the effects of fucoidans on the cell viability of tumor and non-tumor cell lines. *Marine Drugs*, **17**(8), 441. DOI: 10.3390/md17080441
27. Horie M., Tabei Y., Sugino S., Eguchi K., Chiba R., Tajika M. (2019) Comparison of proinflammatory potential of needle-shaped materials: aragonite and potassium titanate whisker. *Arch. Toxicol.*, **93**(10), 2797–2810. DOI: 10.1007/s00204-019-02556-w
28. Picco A., Kukulski W., Manenschijn H.E., Specht T., Briggs J.A.G., Kaksonen M. (2018) The contributions of the actin machinery to endocytic membrane bending and vesicle formation. *Mol. Biol. Cell*, **29**(11), 1346–1358. DOI: 10.1091/mbc.E17-11-0688
29. Jiang M.H., Zhu L., Jiang J.G. (2010) Immunoregulatory actions of polysaccharides from Chinese herbal medicine. *Expert Opin. Ther. Targets*, **14**(12), 1367–1402. DOI: 10.1517/14728222.2010.531010
30. Kim Y.S., Ryu J.H., Han S.J., Choi K.H., Nam K.B., Jang I.H., Lemaitre B., Brey P.T., Lee W.J. (2000) Gram-negative bacteria-binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan that mediates the signaling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J. Biol. Chem.*, **275**(42), 32721–32727. DOI: 10.1074/jbc.M003934200
31. Zhang W., Oda T., Yu Q., Jin J.O. (2015) Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Marine Drugs*, **13**(3), 1084–1104. DOI: 10.3390/md13031084
32. Apostolova E., Lukova P., Baldzhieva A., Katsarov P., Nikolova M., Iliev I., Peychev L., Trica B., Oancea F., Delattre C., Kokova V. (2020) Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of fucoidan: a review. *Polymers (Basel)*, **12**(10), 2338. DOI: 10.3390/polym12102338
33. Nahm C., Koo Y., Yun T., Kim H., Kang B.-T., Yang M.-P. (2023) Fucoidan increases porcine neutrophil extracellular trap formation through TNF- $\alpha$  from peripheral blood mononuclear cells. *J. Vet. Clin.*, **40**(3), 175–181. DOI: 10.17555/jvc.2023.40.3.175
34. Castro R., Zarra I., Lamas J. (2004) Water-soluble seaweed extracts modulate the respiratory burst activity of turbot phagocytes. *Aquaculture*, **229**, 67–78. DOI: 10.1016/S0044-8486(03)00401-0
35. Li H., Liu Y., Zheng Y., Zhang M., Wang X., Cheng H., Xu J., Chen X., Zhao X., Ding Z. (2023) Enhancement of seaweed polysaccharides (fucoidan and laminarin) on the phagocytosis of macrophages via activation of integrin in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Front. Marine Sci.*, **10**, 1124880. DOI: 10.3389/fmars.2023.1124880
36. Герасимов И.Г., Игнатов Д.Ю. (2005) Свертывание крови активует нейтрофилы к респираторному взрыву. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **140**(1), 88–90. [Gerasimov I.G., Ignatov D.Y. (2005) Blood coagulation initiates respiratory burst in neutrophils. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **140**(1), 77–79.] DOI: 10.1007/s10517-005-0416-x
37. Johann S., Zoller C., Haas S., Blümel G., Förster R. (1996) Anticoagulant glycosaminoglycans activate respiratory burst in neutrophils and monocytes. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.*, **2**(2), 116–122. DOI: 10.1177/107602969600200206
38. Li G., Keenan A.C., Young J.C., Hall M.J., Pamuklar Z., Ohman E.M., Steinhubl S.R., Smyth S.S. (2007) Effects of unfractionated heparin and glycoprotein IIb/IIIa antagonists versus bivalirudin on myeloperoxidase release from neutrophils. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27**(8), 1850–1856. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.144576
39. Freitas M., Porto G., Lima J.L., Fernandes E. (2008) Isolation and activation of human neutrophils *in vitro*. The importance of the anticoagulant used during blood collection. *Clin. Biochem.*, **41**(7–8), 570–575. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2007.12.021
40. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Лямкин Г.П., Лоеко Ю.Н., Попов А.М. (1991) Иммуномодулирующие свойства пектина из морской травы *Zostera*. *Антибиотики и химиотерапия*, **36**(8), 31–34. [Zaporozhets T.S., Besednova N.N., Ljamkin G.P., Loenko Ju.N., Popov A.M. (1991) Immunomoduliruiushchie svoistva pektina iz morskoi travy *Zostera* [Immunomodulating properties of pectin from seawater grass *Zostera*]. *Antibiotiki i Khimioterapiya*, **36**(8), 31–34.]
41. Zaitseva O.O., Polezhaeva T.V., Khudyakov A.N., Solomina O.N., Laptev D.S., Svedentsov E.P., Utemov S.V., Kostyaev A.A. (2013) Influence of pectins on NADPH oxidase and phagocytic activity of neutrophils during cryopreservation. *CryoLetters*, **34**(5), 544–548.

Поступила в редакцию: 25. 02. 2025.  
После доработки: 10. 04. 2025.  
Принята к печати: 14. 04. 2025.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE EFFECT OF HYBRID VATERITE MICROPARTICLES  
WITH VARIOUS POLYSACCHARIDES ON NEUTROPHILS ACTIVITY

*D.V. Grigorieva<sup>1\*</sup>, E.V. Mikhalechik<sup>2</sup>, D.V. Mosievich<sup>3</sup>, P.I. Mishin<sup>3</sup>,  
N.G. Balabushevich<sup>3</sup>, O.M. Panasenko<sup>2</sup>, A.V. Sokolov<sup>2,4</sup>, I.V. Gorudko<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Belarusian State University,

4 Nezavisimosti ave., Minsk, 220030 Belarus; \*e-mail: dargr@tut.by

<sup>2</sup>Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,  
1a Malaya Pirogovskaya str., Moscow, 119435 Russia

<sup>3</sup>Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskiye Gory, Moscow, 119991 Russia

<sup>4</sup>Smorodintsev Research Institute of Influenza, 15/17 Prof. Popova str., St. Petersburg, 197376 Russia

Carriers based on natural biominerals attract much attention in the context of the development of new drug delivery systems. In this study, the effects of native (CC) and hybrid vaterite microparticles with the inclusion of dextran sulfate (CCDS), chondroitin sulfate (CCCS), heparin (CCHE), fucoidan (CCFU), and pectin (CCPE) have been investigated on the viability and functional activity of neutrophils. Among the tested preparations, only CCFU exhibited a slight cytotoxic effect. Native CC stimulated actin cytoskeleton rearrangements and cell production of reactive oxygen species (ROS), which decreased in the presence of diphenyleneiodonium chloride (DPI), an inhibitor of NADPH oxidase assembly. The CC-induced NADPH oxidase activation was reduced in the presence of inhibitors of non-receptor tyrosine kinases of the Src family, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), and phospholipase C (PLC). Similar to native CC, hybrid vaterite microparticles also initiated ROS production by neutrophils. After addition of CC and hybrid vaterite microparticles (except CCDS), an increase in the number of neutrophils characterized by higher values of the side scattering value was detected thus indicating a change in the morphological characteristics of the cells. Given the ability of hybrid vaterite microparticles with polysaccharides to activate neutrophil NADPH oxidase, they could be promising systems for the delivery of antibacterial and antiviral drugs.

*The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.*

**Keywords:** vaterite microparticles; polysaccharides; neutrophils; cytotoxicity; NADPH oxidase

**Funding.** The work was supported by a joint grant from the Russian Science Foundation (project No. 23-45-10026) and the Belarusian Republican Foundation for Basic Research (project No. B23RNF-093). Obtaining vaterite microparticles was carried out under partial support from theme No. 121041500039-8 (Lomonosov Moscow State University). The study of the effect of vaterite microparticles on neutrophils viability was supported by a grant from the Ministry of Education of the Republic of Belarus (agreement No. 002/2024-BSU).

Received: 25.02.2025; revised: 10.04.2025; accepted: 14.04.2025.