

На правах рукописи

Михеева Эльза Равилевна

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ АЛЬТЕРАЦИЯ
КЛЕТОК КРОВИ КВАНТОВЫМИ ТОЧКАМИ**

03.03.01 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород
2011

Работа выполнена в Нижегородском государственном техническом университете им. Р.Е. Алексеева

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор

Плескова Светлана Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор

Корягин Александр Сергеевич

доктор биологических наук, профессор

Малиновская Светлана Львовна

Ведущая организация:

ФГБОУ ВПО

«Ульяновский государственный университет»

Защита состоится «__» _____ 2011 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 212.166.15 Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23, корп. 1, биологический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского

Автореферат разослан «__» _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент



С.В. Копылова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Развитие методов морфологического, биохимического и иммунологического анализа, основанных на использовании флюоресцентных меток, сделало флюорофоры одним из важнейших инструментов многих научных направлений. В настоящее время спектр флюоресцентных меток достаточно широк. Условно их можно классифицировать на три основных вида: 1) флюоресцирующие белки; 2) неорганические флюорофоры; 3) квантовые точки (КТ). Наиболее перспективными являются флюоресцентные полупроводниковые наночастицы (НЧ) – квантовые точки, поскольку: 1) они имеют широкий спектр экстинкции и узкий – эмиссии; 2) для них характерна высокая фотостабильность; 3) возможна одновременная регистрация сигнала в мультиплексных системах. Однако одной из основных проблем использования КТ является недостаточная информация о механизмах их взаимодействия с клетками организма человека. Было показано, что КТ в отличие от микрочастиц, способны проникать через клеточные барьеры в неизменном виде, попадать в центральную нервную систему (Oberdorster и соавт., 2005), циркулировать и накапливаться в органах и тканях (Yang и соавт., 2007; Zhang и соавт., 2008), вызывая различные морфологические альтерации в клетках и внутренних органах (Fischer и соавт., 2006). Установлено, что КТ повреждают ДНК, приводят к эпигенетическим и генетическим альтерациям (Hoshino и соавт., 2004; Choi и соавт., 2008), изменениям в митохондриях (Lovric и соавт., 2005) и вызывают разрушение мембран клеток. Альтерирующее воздействие КТ на клеточном уровне было продемонстрировано на: гепатоцитах (Derfus и соавт., 2004); клетках NRK (нормальные почечные клетки крысы) (Kirchner и соавт., 2005); клетках феохромоцитомы крыс P12 и микроглиальных клетках N9 (Lovric и соавт., 2005); клетках WTK1 (клеточная линия человеческих лимфобластов) и клетках Vero (клеточная линия почечных эпителиальных клеток африканских зеленых обезьян) (Hoshino и соавт., 2004); клетках HepG2 (клеточная линия карциномы печени человека) (Guo и соавт., 2007); альвеолярных эпителиальных клетках (Geys и соавт., 2009); яйцеклетках (Chan и соавт., 2008); эпидермальных «базальных» клетках человека (HEK) (Ryman-Rasmussen и соавт., 2007); макрофагах (Clift и соавт., 2010) и других клеточных линиях. Исследования на мышцах и крысах *in vivo* показали, что кумуляция КТ происходит преимущественно в печени, селезенке и почках (Fischer и соавт., 2006; Yang и соавт., 2007; Robe и соавт., 2008). Так же следует учесть, что выявление альтерирующего действия КТ на клетки является не тривиальной задачей, поскольку не все КТ одинаковы и эффекты их взаимодействия с клетками зависят от многих факторов: индивидуальных физико-химических свойств, условий окружающей среды, концентрации, окислительной и механической стабильности и способа проникновения в организм. Однако, при любом механизме проникновения КТ в организм и после преодоления ими первого защитного барьера, они неизбежно оказываются в крови, поэтому становятся

актуальным вопросом о степени альтерирующего воздействия НЧ на клетки крови. В литературе этот вопрос не освещен.

Цель работы: исследовать функциональные, морфологические и биохимические изменения клеток крови человека в системе с квантовыми точками различного состава.

Задачи исследования:

1. определить распределение и накопление квантовых точек в лейкоцитарной фракции крови;
2. провести сравнительный анализ влияния квантовых точек различного состава на жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов. Определить DL_{50} для квантовых точек разного состава;
3. исследовать динамику взаимодействия нейтрофилов с квантовыми точками методами высокоразрешающей сканирующей лазерной и атомно-силовой микроскопии;
4. сравнить морфологические параметры клеток и ригидность мембран нейтрофильных гранулоцитов до и после воздействия квантовых точек;
5. оценить изменения кислородзависимого и кислороднезависимого метаболизма, биохимического и рецепторного статуса нейтрофилов периферической крови человека в системе с квантовыми точками;
6. изучить влияние квантовых точек на скорость оседания эритроцитов человека.

Научная новизна работы. Впервые исследовано распределение квантовых точек среди клеток лейкоцитарной фракции крови и показано, что максимальная кумуляция наблюдается в фагоцитах. Впервые проанализирована динамика взаимодействия нейтрофилов с квантовыми точками и выявлена экстрануклеарная кумуляция квантовых точек, агрегация квантовых точек нейтрофилами, передача агрегатов квантовых точек, феномен избегания взаимодействия с квантовыми точками. Впервые проведен сравнительный анализ воздействия квантовых точек различного состава на жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов. Впервые получены данные об изменении морфофункционального состояния и биохимического статуса нейтрофилов периферической крови при воздействии на них квантовых точек. Впервые выявлено снижение ригидности мембран нейтрофильных гранулоцитов в системе с квантовыми точками. Впервые показано комплексное влияние квантовых точек на кровь человека, отражаемое в изменении скорости оседания эритроцитов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследование эндоцитоза КТ нейтрофилами дополняют теоретические знания о механизмах поглощения ксенобиотиков фагоцитами. Результаты, демонстрирующие, что не только фагоциты способны связывать КТ, представляют новые теоретические данные о сорбции наноматериалов клетками крови, а выявление агрегации КТ

нейтрофилами расширяет теоретические представления о клининговой функции крови. Данные, полученные в результате оценки функциональных и морфологических изменений клеток крови человека, могут быть использованы в разработке систем диагностики цитотоксического действия НЧ. Разработанная модель визуализации позволяет отслеживать как процессы поглощения, так и внутриклеточного трейсинга наноматериалов. Полученные в ходе работы данные позволяют дополнить курс «Физиология человека» и «Медикобиологические основы обеспечения безопасности жизнедеятельности».

Положения, выносимые на защиту:

1. Фагоциты разной степени морфологической и функциональной зрелости одинаково активно поглощают квантовые точки.
2. Альтерирующее воздействие квантовых точек в отношении нейтрофильных гранулоцитов зависит от размера и химического состава наночастиц.
3. Среди вариантов клеточной гибели под воздействием наночастиц основная роль принадлежит некротической гибели.
4. Нейтрофильные гранулоциты поглощают квантовые точки и накапливают их в своем объеме преимущественно внеядерно, в фаголизосомах.
5. Наблюдается снижение кислородзависимого и кислороднезависимого метаболизма нейтрофилов после воздействия любых типов квантовых точек.

Апробация работы. Основные положения работы были доложены и обсуждены: на II международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (г. Казань, 2008), на Международной конференции «Нанотехнологии в онкологии» (г. Москва, 2008), на XII, XV международной Пушинской школе-конференции молодых ученых (г. Пущино, 2008, 2011), на XIII, XIV, XV, XVI сессии молодых ученых (г. Нижний Новгород, 2008, 2009, 2010, 2011), на международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова (Москва-Пущино, 2009), на 1-ой международной научной школе «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах» (г. Москва, 2009), на XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010» (г. Москва, 2010), на III и IV международной конференции «AFM BioMed» (Red Island, Хорватия, 2010 и Париж, Франция, 2011), на международной конференции «Neuroplasticity: nervous substrate for health and disorder» (г. Тбилиси, Грузия, 2010), на XVII Российском симпозиуме по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел «РЭМ-2011» (г. Черноголовка, 2011), на III Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010» (г. Нижний Новгород, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 39 научных работ, из них 3 – в изданиях, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 111 страницах и состоит из введения, 2 глав обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа содержит 38 рисунков и 7 таблиц. Список литературы включает 183 источника, из которых 153 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на клетках, выделенных из венозной гепаринизированной крови здоровых доноров студентов-добровольцев (40 человек), забор крови осуществлялся на базе профилактория НГТУ в утреннее время (м.с. Плесковой С.Н.).

В работе использовано 6 типов квантовых точек: (1) CdSe/ZnS, покрытые меркаптоуксусной кислотой (МУК), максимум эмиссии 607 нм, размером 4-6 нм, полученные в лаборатории В.А. Олейникова (Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, г. Москва); (2) CdSe/CdS, покрытые МУК, максимум эмиссии 596 нм, размером 4-6 нм, синтезированные в лаборатории В.Р. Зломанова (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва); (3) CdSe/ZnS, покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ), максимум эмиссии 565 нм, размером 6-12 нм производства Invitrogen, США; (4) CdSe/ZnS, покрытые меркаптопропионовой кислотой (МПК), максимум эмиссии 620 нм, размером 12 нм, производства ООО НТИЦ «Нанотех-Дубна», г. Дмитров, Россия; (5) (CdSe/CdZnS)ZnS, покрытые полимерной цепочкой, состоящей из остатков полиакриловой кислоты, модифицированной дигидролипоевой кислотой и полиэтиленгликолем (polyT), максимум эмиссии 580 нм, размером 20 нм, производства ООО НТИЦ «Нанотех-Дубна», г. Дмитров, Россия; (6) CdSeCdSZnS/polyT, покрытые – $(\text{Si}(\text{NH}_2)\text{-O})_n$, максимум эмиссии 605 нм, размером 15-20 нм производства ООО НТИЦ «Нанотех-Дубна», г. Дмитров, Россия.

Выделение нейтрофилов проводили по методу И.С. Подосинникова и соавт. (1981) из венозной крови здоровых доноров. Нейтрофилы взвешивали в физиологическом растворе или растворе Хенкса (ГУП ИПВЭ, Москва) в начальной концентрации 10^6 клеток/мл для экспериментов на сканирующем лазерном и зондовом микроскопе, либо в концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл для проведения цитохимических тестов. Жизнеспособность клеток по тесту с трипановым синим составляла 99-100%.

Исследование методом проточной цитофлуориметрии Эксперименты проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Calibur™ Flow Cytometer (Becton Dickinson, USA). Для оценки процента лейкоцитов, сорбировавших и/или накопивших КТ, гепаринизированную кровь инкубировали с КТ, взятыми в конечной концентрации 0,1 мг/мл (37°C , 5-30 мин). Далее вносили 2 мкл 7-AAD (eBioscience, USA) и выдерживали в темноте (4°C , 5 мин). Эритроциты

разрушали лизирующим буфером BD Pharm Lyse™ (Becton Dickinson, USA). Флуоресценцию КТ фиксировали в канале FL 2 (585/42 нм). 7-AAD сигнал фиксировали в канале FL 4 (661/16 нм). Для исследования апоптотической гибели клеток использовали Annexin V-FITC (BD Pharmingen™, США). Нейтрофилы (10^6 клеток/мл) инкубировали с КТ (конечная концентрация 0,02 мг/мл) (37 °С, 60 мин), затем окрашивали Annexin V-FITC. Флуоресценцию Annexin V-FITC фиксировали в канале FL1 (530/30 нм), КТ – FL2 (585/42 нм).

Исследование некротической гибели нейтрофилов Исследование проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus IX71 (Япония) в НОЦ ФТНС ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Нейтрофильные гранулоциты ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) инкубировали с КТ (0,1 мг/мл) в течение 30 мин при 37 °С. Клетки фиксировали 96% этанолом и окрашивали рабочим раствором пропидиума йодида ($5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл, 30 сек). Подсчитывали 100 клеток: из них учитывали клетки, флуоресцирующие за счет комплекса ДНК-PI.

Исследование морфологических изменений нейтрофилов в системе с КТ методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии Исследования проводились в ИПФ РАН (г. Нижний Новгород) на установке, состоящей из инвертированного микроскопа Axiovert 200M, лазерного сканирующего модуля Carl Zeiss LSM 510 и спектрального модуля Carl Zeiss 510 META (Carl Zeiss, Германия). Нейтрофильные гранулоциты в растворе Хенкса вносились в жидкостную термостатируемую ячейку (37° С). Контрольное сканирование образцов в течение 8 ч не влияло на жизнеспособность клеток (жизнеспособность нейтрофилов по окраске трипановым синим составляла 98-99 %). Добавляли квантовые точки и визуализировали взаимодействие КТ с клетками. Для подтверждения локализации квантовых точек внутри лизосом использовали краситель LysoTracker.

Исследования нейтрофилов в системе с КТ методом атомно-силовой микроскопии Исследования проводились на установке SOLVER BIO™ (NT-MDT, Зеленоград) в НОЦ ФТНС ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Для исследования морфологических изменений НГ в системе с КТ в режиме реального времени, а также клеток, фиксированных метанолом, проводили сканирование топографии НГ в полуконтактном режиме с использованием зондов DNP (Veeco, USA) (Плескова и соавт., 2005). Для визуализации сканируемых объектов применялась программа Nova NT-MDT SPM Software (NT-MDT, Зеленоград). Дальнейшая обработка изображений проводилась с использованием программного обеспечения SPM Lab Analysis Only (Topometrix, США).

Исследование методом FS-спектроскопии ригидности мембран клеток Для оценки ригидности мембран использовали метод силовых кривых, получаемых в режиме спектроскопии (Плескова и соавт., 2006). Измерения проводились в контактном режиме с использованием зондов MSCT-Au (Veeco, США). Ригидность мембран НГ оценивалась по модулю Юнга, который рассчитывали согласно теории Герца (Hassan и соавт., 1998; Henderson, Oberleithner, 2000) до и после инкубации с КТ. Все расчеты модуля Юнга проводили в пакете Microsoft Office Excel.

Исследование воздействия квантовых точек на кислородзависимую систему нейтрофилов Кислородзависимую активность нейтрофилов определяли по реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-спонтанный, НСТ-стимулированный зимозаном тесты) (Виксман и Маянский, 1977). Кроме того, подсчитывали индекс стимуляции нейтрофилов и функциональный резерв нейтрофилов (Щербаков, 1989).

Исследование воздействия квантовых точек на кислороднезависимую систему нейтрофилов Активность катионных белков нейтрофилов оценивали по методу В.Е. Пигаревского (1988).

Исследование биохимических изменений нейтрофилов в системе с квантовыми точками Активность кислой фосфатазы оценивали цитохимическим методом, предложенным Burstone и Li с соавт. (1970). Для цитохимического определения активности щелочной фосфатазы использовали метод азосочетания по Rutenburg с соавт. (1965). В каждой мазке подсчитывали 100 клеток, среди которых определяли процент нейтрофилов, содержащих отложения соответствующего красителя и подсчитывали средний цитохимический коэффициент (СЦК) (Рудик и Тихомирова, 2006).

Исследование способности нейтрофилов к C3b-зависимой адгезии Определение рецепторзависимой (C3b/ iC3b-, IgG-) и неспецифической адгезии нейтрофилов на гранулах сефадекса проводилось по методу А.Н. Маянского и соавт. (1991).

Исследование спектральных характеристик квантовых точек после инкубации с нейтрофилами Исследование проводилось на специализированном зондовом микроскопическом/спектроскопическом комплексе Ntegra Spectra (NT-MDT, Россия). Накачка КТ осуществлялась твердотельным лазером (0,14 мВт, 473 нм) в течение 0,1 с. До и после инкубации КТ с НГ измеряли спектр эмиссии наночастиц.

Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) Скорость оседания эритроцитов оценивали по методу Т.П. Панченкова. Венозную кровь инкубировали с КТ (30 мин, 37⁰С) и переносили в капилляры Панченкова. Через 1 час определяли СОЭ по высоте столба прозрачной плазмы.

Статистическая обработка результатов Статистический анализ проводили при помощи программного обеспечения Origin 7.0 SRO (OriginLab Corporation, США) по общепринятой методике (Гланц, 1998). Рассчитывали выборочное среднее и стандартное отклонение. Для сравнения двух групп использовали критерий Стьюдента. Статистически значимыми различия между группами признавались при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка распределения квантовых точек в лейкоцитарной фракции крови

Методом проточной цитофлуориметрии было проанализировано распределение КТ в лейкоцитарной фракции крови (инкубация в течение 25 - 75 мин). Определяли процент клеток, которые поглотили и/или сорбировали на

себе НЧ (рис. 1). Максимальное поглощение КТ отмечено для фагоцитов крови. Представленные данные позволяют дать оценку времени сорбции и/или поглощения наночастиц CdSe/ZnS-МПК клетками: для фагоцитов 50% барьер был преодолен менее чем за 25 минут, тогда как для лимфоцитов понадобилось значительно больше времени – 75 минут. Традиционно считалось, что максимальную фагоцитарную активность нейтрофилы проявляют после адгезии, а моноциты – после выхода в ткани и перехода в форму тканевого макрофага. Представленные же результаты демонстрируют высокий поглощающий потенциал клеток, несмотря на то, что они находились в суспензионной форме.

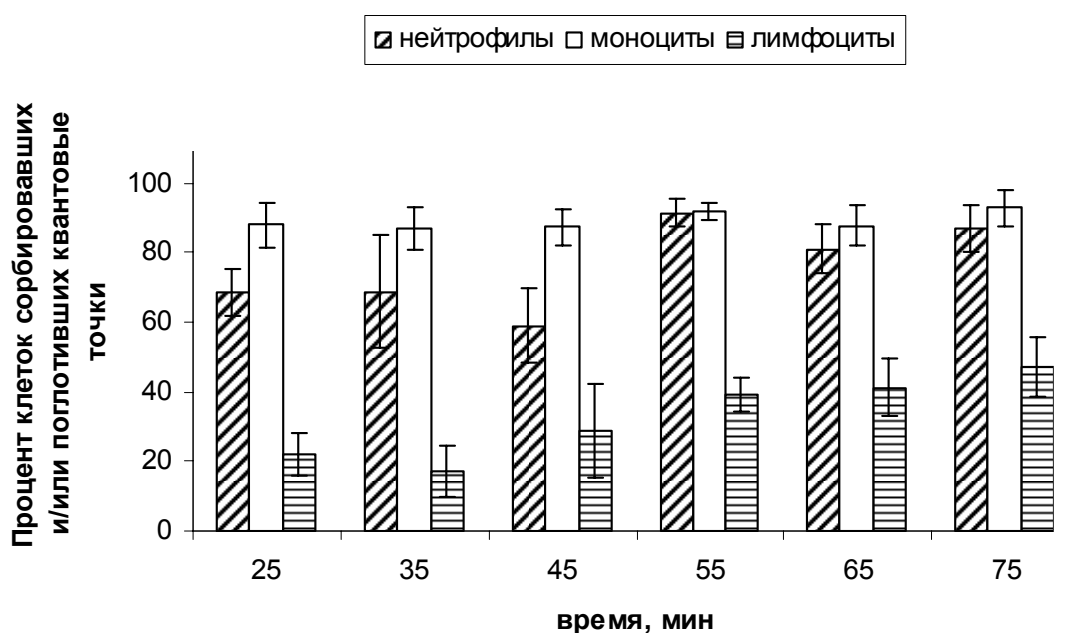


Рис. 1. Диаграмма сорбции и/или поглощения квантовых точек CdSe/ZnS-МПК (конечная концентрация 0,1 мг/мл) клетками крови.

Необычным результатом инкубации клеток крови с КТ (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT стал тот факт, что связывание и/или поглощение моноцитами данного типа НЧ было практически в два раза больше, чем у нейтрофилов (рис. 2). Однако максимальный процент сорбции и/или поглощения наночастиц моноцитами и нейтрофилами был достигнут уже на 35 минуте инкубации, тогда как для CdSe/ZnS-МПК – через 55 минут. Объяснением этого феномена может служить различие в размерах наночастиц: (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT – 20 нм, а CdSe/ZnS-МПК – 12 нм. С другой стороны, причиной различия в поглощении может быть и химия покрытия КТ. Поскольку покрытие polyT представляет собой полимер, состоящий из множества длинноцепочечных фрагментов модифицированных кислот, то в жидкой среде они могут связываться с водой, изменяя свою конформацию и тем самым увеличивая гидрофильность КТ, что впоследствии затрудняет их фагоцитоз.

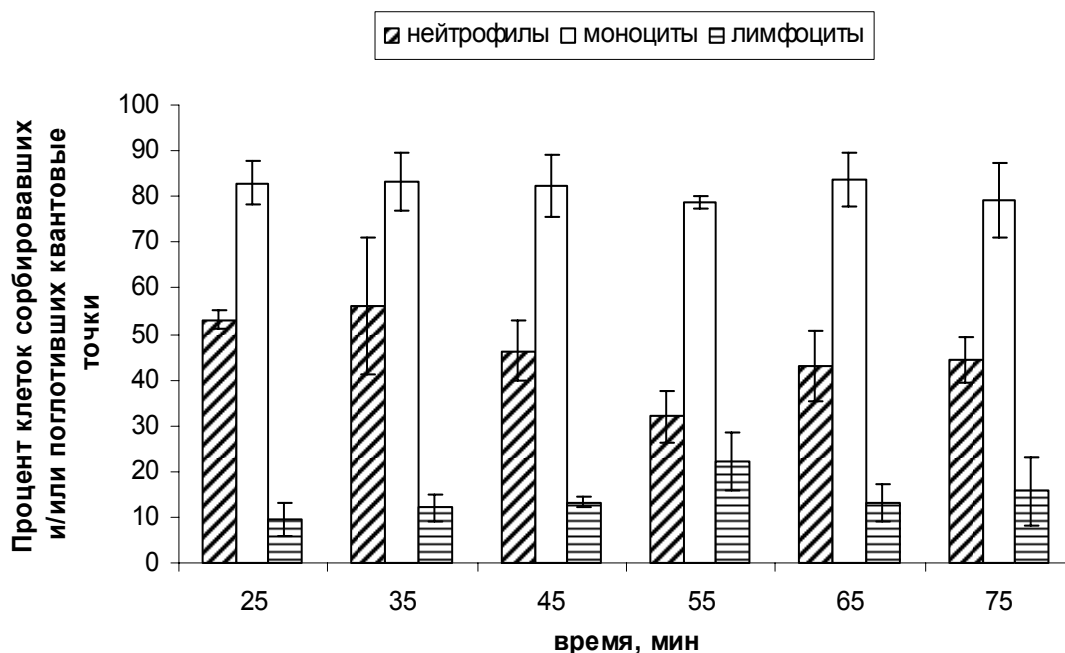


Рис. 2. Диаграмма сорбции и/или поглощения квантовых точек (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT (конечная концентрация 0,1 мг/мл) клетками крови.

Таким образом, КТ предположительно активно сорбировались и/или поглощались фагоцитами крови и гораздо менее активно связывались с лимфоцитами. Поскольку НГ в крови доминируют среди остальных фракций лейкоцитов и выполняют полифункциональную роль в осуществлении неспецифической резистентности организма, впоследствии именно они использовались нами в качестве основной модели для тестирования альтерирующего воздействия КТ.

Оценка жизнеспособности нейтрофильных гранулоцитов в системе с квантовыми точками

В результате окраски клеток пропидиумом йодидом ($5 \cdot 10^{-5}$ мг/мл) был зафиксирован дозозависимый эффект снижения жизнеспособности НГ после инкубации с КТ (рис. 3-5). Методом экстраполяции кривой жизнеспособности НГ было найдено значение DL_{50} : для CdSe/ZnS-МПК оно составило 0,025 мг/мл, для (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT – 0,04 мг/мл и для CdSeCdSZnS/polyT-SiO₂-NH₂ – 16,5 мг/мл. Таким образом, наиболее токсичными в отношении НГ являются КТ CdSe/ZnS-МПК.

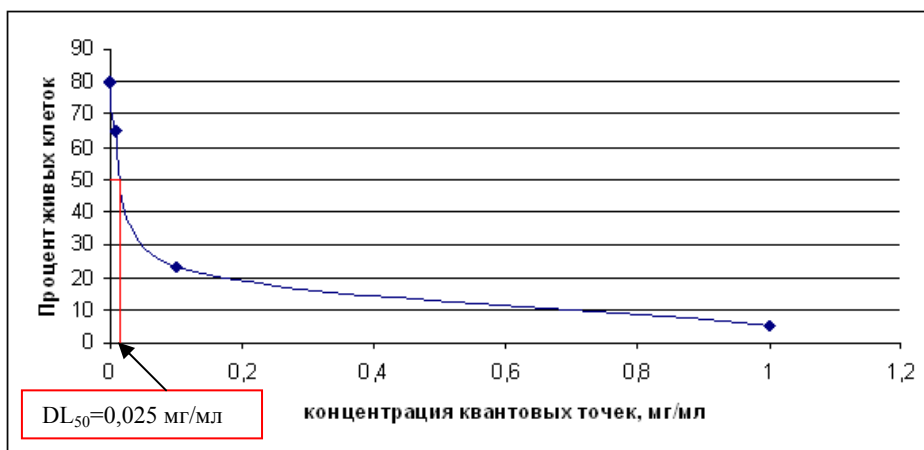


Рис. 3. Дозозависимое снижение жизнеспособности НГ в системе с КТ CdSe/ZnS-МПК после 30 мин инкубации



Рис. 4. Дозозависимое снижение жизнеспособности НГ в системе с КТ (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT после 30 мин инкубации

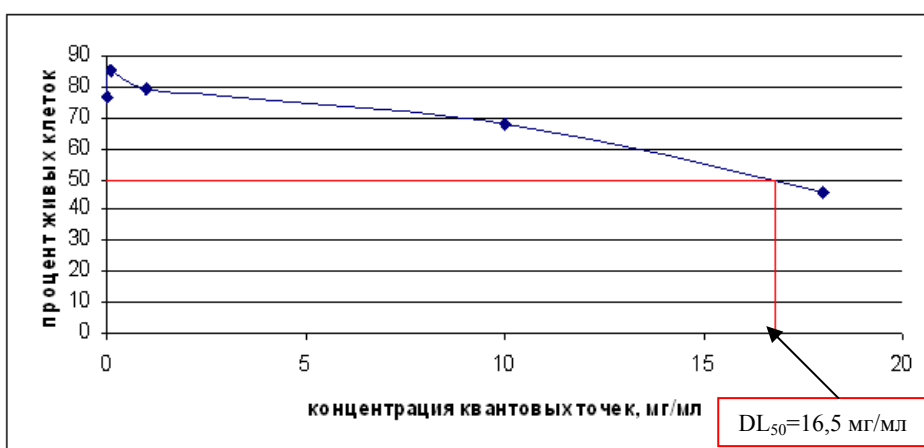


Рис. 5. Дозозависимое снижение жизнеспособности НГ в системе с КТ CdSeCdSZnS/polyT/SiO₂-NH₂ после 30 мин инкубации

Исследование некроз/апоптотических соотношений для НГ в системе с КТ (0,1 мг/мл) показало, что гибель клеток по механизму апоптоза маловероятна (рис. 6), поскольку процент нейтрофилов, у которых выявлены витронектиновые метки колеблется от 5 до 40%, в то время как некротическое

разрушение клеток при аналогичной концентрации КТ (0,1 мг/мл) и времени экспозиции НГ с НЧ, достигает 66-77%. Аналогично J. Lovric и соавт. (2005) показали увеличение числа клеток рака молочной железы MCF7, окрашенных PI, после их инкубации с КТ CdTe-МПК, что позволило авторам сделать вывод о некротической гибели клеток в системе с КТ. J. Lovric и соавт. (2005) определили, что причиной гибели клеток были собственные АФК, вырабатываемые клетками MCF7, которые впоследствии повреждали клеточную мембрану.

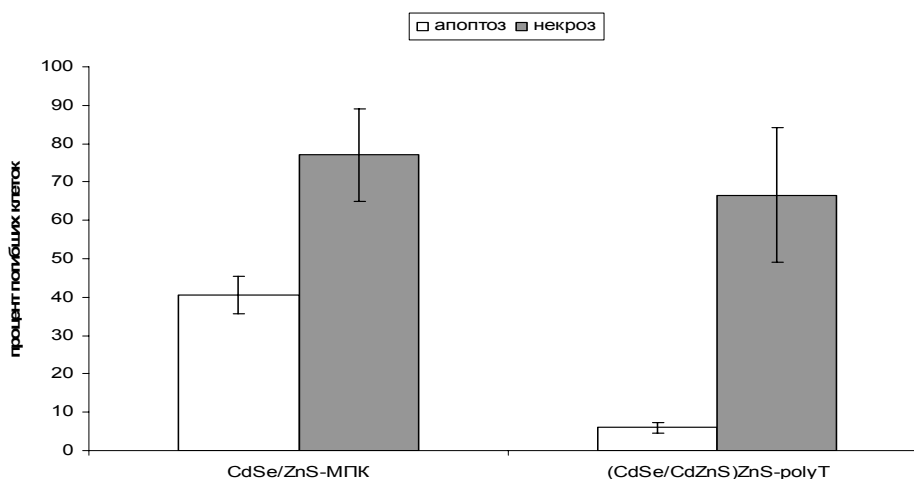


Рис. 6. Оценка некроз/апоптотических соотношений после пребывания НГ в системе с КТ (КТ взяты в концентрации 0,1 мг/мл, время инкубации 30 мин).

В тоже время отмечено, что при инкубации с наноматериалами возможны и другие варианты клеточной гибели, в частности, инкубация с КТ CdSe/ZnS-МПК вызывает образование NET (neutrophil extracellular traps) – вариант гибели НГ, впервые описанный V. Brinkmann и соавт. (2004) для клеток, принимающих активное участие в реализации воспаления. Кроме того отмечается блеббинг мембраны нейтрофилов, описанный в работе С.Н. Плесковой (2009) для НГ и вакуолизация мембран, приписываемая к аутофагии S.T. Stern и соавт. (2008).

Визуализация динамики взаимодействия и морфологических изменений нейтрофилов в системе с квантовыми точками

Методом конфокальной микроскопии было зафиксировано, что при внесении к НГ квантовых точек CdSe/ZnS-МПК в концентрации 2 мг/мл, наблюдалось быстрое осаждение КТ на поверхности стекла и нейтрофилов, активное проникновение агрегатов НЧ в клетки. НГ интенсивно перемещались, стремясь объединиться, образовывали псевдоподии. Методом атомно-силовой микроскопии так же было выявлено, что после инкубации НГ с КТ CdSe/ZnS-МПК (0,1 мг/мл), клетки формировали множественные сетевые контакты друг с другом, при этом размеры этих сетевых структур превышали размеры псевдоподий, формируемых интактными нейтрофилами. На некоторых участках отмечается особая морфология псевдоподий: они выглядели

«раздавленными», в отличие от всегда четко структурированных псевдоподий, формируемых НГ при фагоцитозе микроорганизмов. Часть НГ интенсивно поглощало КТ, другие агрегировали НЧ и обменивались ими с соседними нейтрофилами. Некоторые НГ пытались избежать контакта с агрегатами точек, создавая «карманы». Через 20 минут НГ начинали гибнуть, наблюдался процесс блеббинга цитоплазмы с образованием волдырчатых структур в клетке и концентрирование КТ в объеме нейтрофилов. Через 40 мин после начала инкубации с КТ все НГ погибли, на видеозахвате визуализировались только тени клеточных мембран.

При уменьшении концентрации КТ нейтрофилы по-прежнему поглощали НЧ и накапливали их в своем объеме. Агрегаты КТ визуализировались по периметру клетки, формируя «ореол», который также наблюдали J.D. Martin и соавт. (2008) и Т.Н. Беляева и соавт. (2009). Часть КТ аккумулировалась над клеткой в виде «шапки» (рис. 7). Через 30-35 минут объем клеток уменьшался, а через 55-60 минут происходил блеббинг цитоплазмы и гибель клеток. Через 1 час визуализировались только тени клеток.



Рис. 7. Накопление нейтрофилами квантовых точек CdSe/ZnS–МУК (0,06 мг/мл) на поверхности, 3D-изображение (конфокальная флуоресцентная микроскопия, объектив X100)

В отличие от КТ CdSe/ZnS–МУК, результатом инкубации НГ с CdSe/ZnS-ПЭГ стало сохранение жизнеспособности клеток в течение 4 ч экспозиции. НГ также поглощали CdSe/ZnS-ПЭГ и накапливали их в своем объеме. Для данного типа КТ не наблюдалось «вскипание» цитоплазмы, клетки претерпевали минимальные морфологические изменения, через 5 ч инкубации жизнеспособность клеток составляла 63 %.

Для подтверждения факта поглощения и накопления КТ в клетках был проведен тест с красителем LysoTracker. В результате исследования было доказано фаголизосомальное накопление КТ в НГ. В условиях низких значений рН внутри фаголизосом КТ способны к агрегации, которая наблюдалась в нашей работе, а также была описана I. Nabiev и соавт. (2007) и Y. Xiao и соавт. (2010). С другой стороны, в лизосомах присутствует большое количество протонов, которые легко соединяются с покрытием КТ МПК или МУК, что приводит к постепенному отделению этого покрытия и к деградации КТ в клетках. В результате этого может обнажиться кадмий-содержащий кор, токсичный для клетки (Derfus и соавт., 2004).

Для проверки гипотезы о внутриклеточной деградации КТ было проведено исследование спектра флуоресценции КТ до и после пребывания в системе с НГ. В результате получили, что для КТ CdSe/ZnS-МПК максимум флуоресценции уменьшается, следовательно, покрытие КТ в клетках постепенно разрушается. Для CdSeCdSZnS/polyT/SiO₂-NH₂ спектр

флюоресценции практически не меняется после инкубации их с НГ в течение 30 мин, тогда как для КТ (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT наблюдается увеличение значения пика флюоресценции, что может свидетельствовать об увеличении размеров КТ вследствие их коагрегации.

Помимо морфологических изменений было выявлено дозозависимое снижение упругости мембран НГ после воздействия на них КТ CdSe/CdS – МПК (табл. 1).

Таблица 1

Изменение упругости мембраны НГ при инкубации с CdSe/CdS – МПК

	контроль	Концентрация КТ, мг/мл	
		0,06	0,1
модуль упругости, кПа	26,46 ± 2,49	10,18±1,56*	4,83 ± 1,05*
* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p<0,05)			

Таким образом, тип КТ влияет на характер взаимодействия их с клеткой, что в последующем может быть определяющим фактором варианта гибели клеток. Поскольку апоптоз нейтрофилов может быть вызван действием свободных ионов Cd²⁺, образующихся при деградации КТ, а для разрушения КТ необходимо достаточно длительное время, то некротическая гибель клеток становится наиболее вероятным механизмом, что также подтверждается результатами, полученными нами методом проточной цитометрии.

Оценка функционального состояния нейтрофилов в системе с квантовыми точками

Интенсивность одного из ведущих звеньев фагоцитоза – продукции АФК можно оценить по способности клеток восстанавливать нитросиний тетразолий (НСТ) *in vitro* (НСТ-тест) (Маянский, Маянский, 1989; Маянский и соавт., 1999). Как в спонтанном, так и в стимулированном НСТ-тестах наблюдается уменьшение числа клеток с диформазаном (табл. 2) после инкубации НГ с КТ. В спонтанном НСТ-тесте наибольшее снижение числа НСТ-позитивных клеток было выявлено для НГ, проинкубированных с CdSe/ZnS-МПК, тогда как в стимулированном НСТ-тесте – для НГ с (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT. Также следует заметить, что в стимулированном НСТ-тесте активность клеток снижается больше, чем в спонтанном по сравнению с контролем. Причиной этого может служить срыв защитных механизмов НГ и невозможность ими нейтрализовать новые порции АФК, выделяемые клеткой при контакте с КТ.

Был рассчитан индекс стимуляции (ИС) и функциональный резерв нейтрофилов (ФРН). Для НГ в системе с КТ CdSe/ZnS-МПК и CdSeCdSZnS/polyT/SiO₂-NH₂ была характерна тенденция к увеличению ИС, тогда как для (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT ИС снижался. ФРН для клеток, проинкубированных с КТ, уменьшался, причем в наибольшей степени для НГ в системе с (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT, что свидетельствует об истощении функциональной активности НГ.

Выявлено дозозависимое снижение респираторной активности НГ после инкубации (60 мин) с КТ CdSe/CdS – МУК, как в спонтанном (рис. 8), так и в стимулированном зимозаном НСТ-тесте (рис. 9).

Таблица 2

Показатели функциональной активности НГ периферической крови до и после инкубации с КТ (концентрация КТ 0,1 мг/мл).

группа / показатель	контроль	НГ после инкубации с CdSe/ZnS-МПК	НГ после инкубации с (CdSe/CdZnS) ZnS-polyT	НГ после инкубации с CdSeCdSZnS/poly T/SiO ₂ -NH ₂
Число НСТ-положительных клеток в спонтанном тесте	12,80±0,90	6,80±2,60*	8,80±0,80*	7,70±1,80*
Число НСТ-положительных клеток в стимулированном тесте	40,50±12,40	24,50±3,90*	20,30±4,30*	23,20±3,70*
ИС НГ	3,17±0,97	3,96± 1,41	2,31±0,41	3,21±1,11
ФРН	29,80±10,20	17,70±3,80*	11,50±3,90*	15,50±4,40*

* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p<0,05)

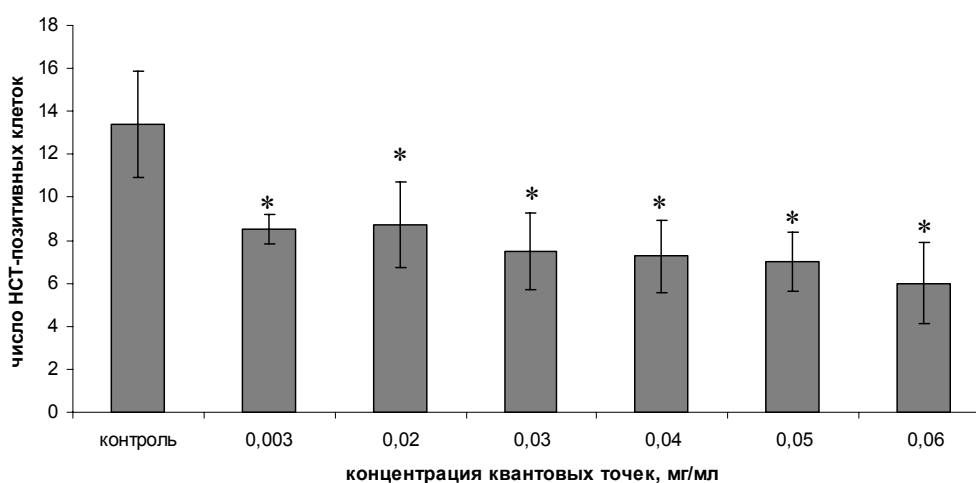


Рис. 8. Снижение спонтанной респираторной активности нейтрофилов под действием квантовых точек CdSe/CdS – МУК (* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p<0,05))

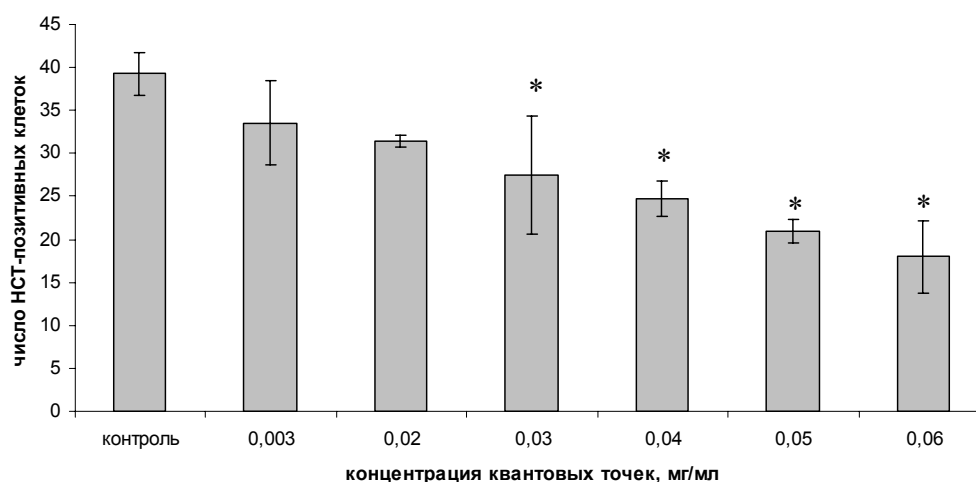


Рис. 9. Снижение стимулированной респираторной активности нейтрофилов под действием квантовых точек CdSe/CdS – МУК (* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$))

Было обнаружено увеличение количества диформаза вне клеток наряду с наличием разрушенных нейтрофилов при увеличении концентрации КТ. Это может свидетельствовать о подавлении резистентности нейтрофилов к АФК и о некротической гибели клеток.

Уровень катионных белков (КБ) характеризует кислороднезависимую бактерицидную систему НГ, их способность к внутриклеточному и внеклеточному киллингу (Нагоев и соавт., 1982). По результатам наших исследований уровень КБ НГ в системе с КТ статистически значимо ниже, чем в контроле (табл. 3).

Таблица 3

Средний цитохимический коэффициент (СЦК) КБ НГ в системе с КТ

контроль	НГ после инкубации с CdSe/ZnS-МПК	НГ после инкубации с (CdSe/CdZnS) ZnS-polyT	НГ после инкубации с CdSeCdSZnS/polyT/SiO ₂ -NH ₂
1,37±0,10	0,89±0,16*	0,88±0,04*	0,97±0,06*

* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Подобная динамика может быть связана с экскрецией КБ из гранул НГ во внеклеточную среду после воздействия КТ. Снижение СЦК КБ для каждого типа КТ – различно. Подсчет изменений количества высокоактивных, среднеактивных и малоактивных клеток, различающихся по степени интенсивности окрашивания показал, что количество высокоактивных клеток становится меньше после инкубации с НЧ CdSeCdSZnS/polyT/SiO₂-NH₂ по сравнению с двумя другими типами КТ. Однако, после инкубации с CdSe/ZnS-МПК и (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT количество малоактивных клеток увеличивается в большей степени, чем с CdSeCdSZnS/polyT/SiO₂-NH₂ (рис. 10).

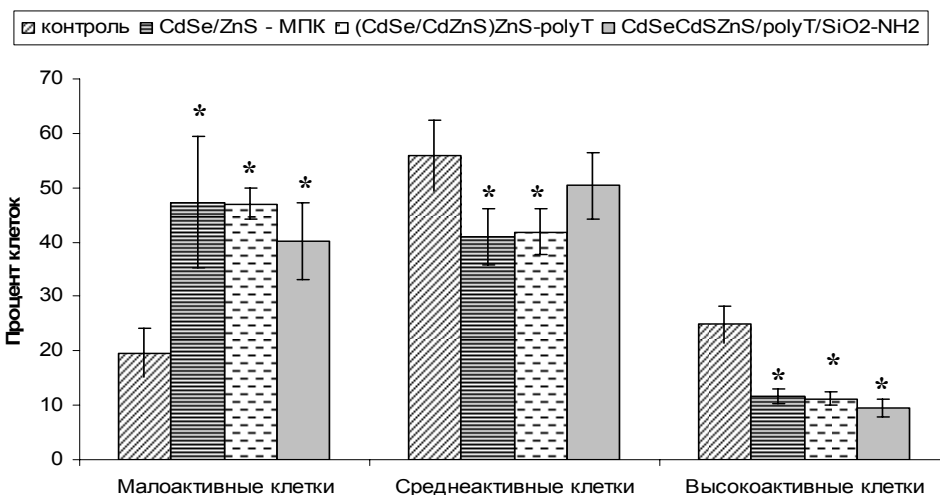


Рис. 10. Изменения количества высокоактивных, среднеактивных и малоактивных клеток в системе с КТ (* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$))

Таким образом, было выявлено альтерирующее воздействие КТ на кислородзависимую и кислороднезависимую активность НГ.

Оценка биохимических изменений нейтрофилов в системе с квантовыми точками

Интенсивность процессов клеточного катаболизма и переваривающей способности лейкоцитов многие авторы связывают с активностью одного из важнейших лизосомальных ферментов – кислой фосфатазы (КФ) (Соколов и соавт., 1975). Уровень КФ в НГ после воздействия КТ статистически значимо снижался по сравнению с контролем (рис. 11).

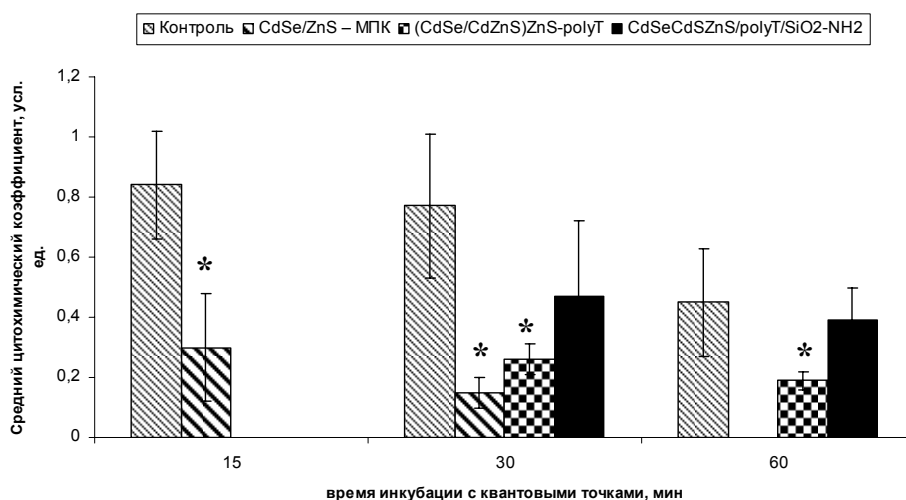


Рис. 11 Изменение активности кислой фосфатазы нейтрофилов после 30 мин инкубации с квантовыми точками, взятыми в концентрации 0,1 мг/мл. (* – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$))

Причем активность фермента уменьшалась при увеличении времени инкубации НЧ с клетками

Уровень активности щелочной фосфатазы (ЩФ) следует рассматривать как индикатор напряжения функции клеток, поскольку он оказывает влияние на ход окислительно-восстановительных процессов в клетках и играет важную роль в осуществлении фагоцитарной функции лейкоцитами (Шубич, 1966). По нашим данным СЦК ЩФ также уменьшался со временем, причем наибольшее снижение наблюдалось для CdSe/ZnS-МПК, как и в случае уменьшения активности КФ (рис. 12).

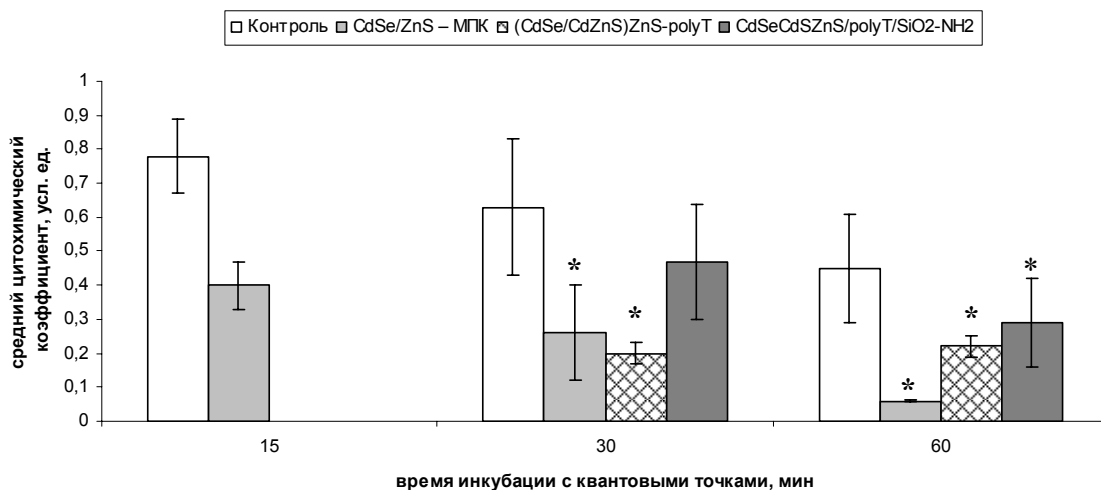


Рис. 12 Изменение активности щелочной фосфатазы нейтрофилов после 30 мин инкубации с квантовыми точками, взятыми в концентрации 0,1 мг/мл. (* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p<0,05))

С целью определения влияния наночастиц на рецепторное звено клеток был проведен тест, основанный на оценке адгезивной способности нейтрофилов в реакции С3b-зависимой адгезии на гранулах сефадекса. КТ CdSe/ZnS-МПК и (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT вызывали увеличение С3b-зависимой адгезии нейтрофилов на гранулах сефадекса, тогда как для третьего типа CdSeCdS ZnS/polyT/SiO₂-NH₂ выявлено снижение этой способности (табл. 4).

Таблица 4

Количество опсонированного сефадекса, связанного с нейтрофилами			
контроль	CdSe/ZnS - МПК	(CdSe/CdZnS)ZnS-polyT	CdSeCdS ZnS/polyT/SiO ₂ -NH ₂
29,6±13,3	31,8±11,2	37,8±7,4	21,7±6,2
* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p<0,05)			

Однако полученные результаты не были статистически значимыми, что не позволяет сделать вывод об изменении уровня рецепторов на мембране под влиянием НЧ.

Оценка комплексного воздействия квантовых точек на кровь

Оценку комплексного воздействия КТ на кровь проводили по изменению скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Результаты исследований показали снижение СОЭ после инкубации КТ (0,1 мг/мл) с кровью в течение 30 мин, причем наибольшее снижение СОЭ наблюдалось при воздействии квантовых точек CdSe/ZnS – МПК (табл. 5).

Таблица 5

Значение СОЭ после инкубации с квантовыми точками (0,1 мг/мл)

Показатель	контроль	CdSe/ZnS – МПК	(CdSe/CdZnS)ZnS -polyT	CdSeCdSZnS/polyT/SiO ₂ -NH ₂
СОЭ, мм	7,1±1,9	4,9±1,9*	3,8±1,8*	3,4±1,6*

* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p<0,05)

Наиболее частой причиной значительного уменьшения СОЭ является увеличение вязкости крови. В нормальной среде отрицательно заряженные эритроциты взаимно отталкиваются. Слабо заряженные крупнодисперсные белки, адсорбируясь на эритроцитах, уменьшают их поверхностный заряд, эритроциты начинают сближаться и быстрее оседают. Поскольку квантовые точки CdSe/ZnS – МПК на поверхности имеют отрицательный заряд, то можно предположить, что данный тип квантовых точек и эритроциты будут взаимно отталкиваться, следовательно, снижение СОЭ для них минимально. Также на СОЭ может влиять изменение pH крови. Проведенные эксперименты показали, что после инкубации с квантовыми точками, pH крови уменьшилась (табл. 6), следовательно, уменьшение СОЭ можно связать с изменением pH крови.

Таблица 6

Значения pH цитратной крови до и после инкубации с квантовыми точками (0,1 мг/мл, 30 мин инкубации, 25 °С)

контроль	7,43±0,07
CdSe/ZnS – МПК	7,34±0,04
(CdSe/CdZnS)ZnS-polyT	7,34±0,03*
CdSeCdSZnS/polyT/SiO ₂ -NH ₂	7,35±0,06

* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (p<0,05)

Таким образом, было показано альтерирующее действие полупроводниковых наночастиц на клетки крови, которое отразилось в снижении функционального резерва нейтрофилов, изменении морфологических и биохимических параметров нейтрофилов, снижении СОЭ.

ВЫВОДЫ

1. Квантовые точки кумулируются преимущественно в фагоцитарной фракции лейкоцитов крови. Наибольшее поглощение и/или сорбция отмечена для моноцитов.
2. Выявлено дозозависимое снижение жизнеспособности нейтрофильных гранулоцитов в системе с квантовыми точками. DL_{50} отличается в зависимости от состава квантовых точек: для CdSe/ZnS-МПК она составила 0,025 мг/мл; для (CdSe/CdZnS)ZnS-polyT – 0,04 мг/мл; для CdSeCdSZnS/polyT/SiO₂-NH₂ – 16,5 мг/мл.
3. Альтерация квантовыми точками проявляется гибелью клеток по разным механизмам: некроз (до 77%), апоптоз (до 40%). Среди вариантов гибели клеток отмечается также блеббинг, аутофагия и neutrophil extracellular traps.
4. Ригидность мембран является чувствительным критерием альтерации клеток квантовыми точками. Модуль упругости (модуль Юнга) мембран клеток значительно снижается после воздействия наночастиц.
5. Альтерация нейтрофилов периферической крови квантовыми точками проявляется в подавлении кислородзависимого и кислороднезависимого метаболизма клеток: снижается уровень АФК-генерирующей способности, активности кислой и щелочной фосфатаз и количество катионных белков.
6. Снижение скорости оседания эритроцитов характеризует комплексное токсическое воздействие квантовых точек на кровь.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Плескова С.Н. Нарушения ферментативной активности нейтрофильных гранулоцитов под воздействием наноразмерных флуорофоров / Плескова С.Н., **Михеева Э.Р.**, Горшкова Е.Н., Хомутов А.Е. // Вестник Нижегородского Университета им. Н.И. Лобачевского. – 2010. – № 5 (1). – с. 106-109.
2. Плескова С.Н. Исследование биосовместимости нанопорошка с флюоресцирующим центром Eг/Yb в системе с нейтрофильными гранулоцитами / Плескова С.Н., Горшкова Е.Н., **Михеева Э.Р.**, Шушунов А.Н. // Цитология. – 2011. – Т.53 (№5). – с. 444-449.
3. Плескова С.Н. Модуляция кислородзависимого и кислороднезависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов квантовыми точками / Плескова С.Н., **Михеева Э.Р.** // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 151. – № 4. – с. 452-454.

Статьи в журналах:

4. Гиматдинова Э.Р. Цитотоксический эффект квантовых точек на нейтрофильные гранулоциты / **Гиматдинова Э.Р.**, Плескова С.Н., Балалаева И.В. // Структура и динамика молекулярных систем. – 2008 – Т. 2. – с. 394-398.
5. Михеева Э.Р. Цитохимический анализ нейтрофильных гранулоцитов в системе с квантовыми точками / **Михеева Э.Р.**, Плескова С.Н., Горшкова Е.Н.,

Пудовкина Е.Е. // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2010. – № 10. – с. 17-19.

6. Горшкова Е.Н. Влияние флуоресцентных наночастиц Er/Yb на биохимические реакции нейтрофильных гранулоцитов / Горшкова Е.Н., Плескова С.Н., **Михеева Э.Р.**, Пудовкина Е.Е. // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2010. – № 10. – с. 15-17.

Статьи в сборниках научных трудов:

7. Михеева Э.Р. Фотоиндуцированные (лазерной энергией) и темновые токсические эффекты квантовых точек в системе *in vitro* / **Михеева Э.Р.**, Плескова С.Н., Балалаева И.В., Горшкова Е.Н. // Труды 2-ой Всероссийской научной школы для молодежи «Концентрированные потоки энергии в индустрии наносистем, материалов и живых систем». Москва. – 2009. – с. 268-273.

8. Горшкова Е.Н. Влияние флуоресцирующих частиц Er/Yb на нейтрофильные гранулоциты / Горшкова Е.Н., Плескова С.Н., **Михеева Э.Р.** // Труды 2-ой Всероссийской научной школы для молодежи «Концентрированные потоки энергии в индустрии наносистем, материалов и живых систем». Москва – 2009. – с. 135-139.

9. Михеева Э.Р. Исследование методом проточной цитометрии взаимодействия квантовых точек с клетками крови человека / **Михеева Э.Р.**, Плескова С.Н., Горшкова Е.Н., Пудовкина Е.Е. // Сборник трудов I всероссийская интернет-конференция «Современные проблемы биохимии и бионанотехнологии». Казань. – 2010. – с. 106-108.

10. Михеева Э.Р. Влияние квантовых точек на клетки крови человека / **Михеева Э.Р.** // Материалы форума «Перспективы и риски использования наноматериалов в технических и природных системах». Москва. – 2009. – с. 124-130.

11. Михеева Э.Р. Влияние наноматериалов на активность миелопероксидазы нейтрофильных гранулоцитов / **Михеева Э.Р.**, Плескова С.Н., Горшкова Е.Н., Пудовкина Е.Е. // Сборник трудов первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». Санкт-Петербург. – 2010. – с. 284-285.

Статьи, опубликованные в материалах международных конференций и конгрессов:

12. Гиматдинова Э.Р. Цитотоксический эффект квантовых точек на нейтрофильные гранулоциты / **Гиматдинова Э.Р.**, Плескова С.Н. // Материалы II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». Казань. – 2008. – с. 155-156.

13. Гиматдинова Э.Р. Морфологическая неоднородность нейтрофильных гранулоцитов в системе с квантовыми точками / **Гиматдинова Э.Р.**, Плескова С.Н. // Сборник тезисов 12 Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино. – 2008. – с. 172-173.

14. Гиматдинова Э.Р. Цитотоксические свойства квантовых точек / **Гиматдинова Э.Р.**, Плескова С.Н., Балалаева И.В. // VIII Международная молодежная научно-техническая конференция «Будущее технической науки». Н.Новгород. – 2009. – с. 306.
15. Михеева Э.Р. Поглощение квантовых точек нейтрофильными гранулоцитами и эффекты их взаимодействия с клетками / **Михеева Э.Р.**, Плескова С.Н., Балалаева И.В. // Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова. Сборник тезисов. Москва-Пушино. – 2009. – Т. 2. – с. 153-156.
16. Гиматдинова Э.Р. Влияние квантовых точек на функциональную активность нейтрофилов / Гиматдинова Э.Р. // Сборник тезисов 13 Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино. – 2009. – с. 98-99.
17. Плескова С.Н. Бицидные свойства наноматериалов / Плескова С.Н., Балалаева И.В., **Гиматдинова Э.Р.**, Горшкова Е.Н., Голубева И.С., Першин Е.А., Весновских Е.Ю. // Материалы 1-ой Международной научной школы «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах». Москва. – 2009. – с. 312-314.
18. Горшкова Е.Н. Лизосомально-катионный тест для исследования воздействия нанопорошка Er/Yb на нейтрофильные гранулоциты / Горшкова Е.Н., Плескова С.Н., **Михеева Э.Р.**, Пудовкина Е.Е. // Сборник тезисов 14 Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино. – 2010. – с. 119.
19. Ekaterina N. Gorshkova AFM application in research of integration Neutrophils with Er/Yb nanoparticles / Ekaterina N. Gorshkova, Svetlana N. Pleskova, **Elza R. Mikheeva** // Third international meeting on AFM in life sciences and medicine. Red Island, Croatia. – 2010. – p. 104.
20. Elza R. Mikheeva Research of the semiconductor nanoparticles influence on the neutrophil granulocytes by AFM / **Elza R. Mikheeva**, Svetlana N. Pleskova, Ekaterina N. Gorshkova // Third international meeting on AFM in life sciences and medicine. Red Island, Croatia. – 2010. – p. 113.
21. Svetlana N. Pleskova Using of AFM for morphological and visco-elastic characteristics of living cells under hydrogen peroxide conditions / Svetlana N. Pleskova, **Elza R. Mikheeva**, Ekaterina N. Gorshkova // Third international meeting on AFM in life sciences and medicine. Red Island, Croatia. – 2010. – p. 119.
22. Плескова С.Н. Проявление токсичности квантовых точек в реакциях с нейтрофилами / Плескова С.Н., Балалаева И.В., Гущина Ю.Ю., **Гиматдинова Э.Р.**, Сергеева Е.А. // Тезисы докладов I Международного конгресса по нанотехнологиям, конференции «Нанотехнологии в онкологии». Москва. – 2008. – с. 160.
23. Михеева Э.Р. Ослабление кислород-независимых реакций нейтрофилов под воздействием квантовых точек / **Михеева Э.Р.** // Тезисы докладов XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2010», секция «Биология». Москва. – 2010. – с. 32.

24. Pleskova Svetlana Nanomechanical properties of living cells under different conditions estimated by AFM / Pleskova Svetlana, Gorshkova Ekaterina, **Mikheeva Elza** // Neuroplasticity: nervous substrate for health and disorder/ ISTC international scientific workshop abstract book. Tbilisi, Georgia. – 2010. – p. 56-57.
25. Михеева Э.Р. Модуляция ферментативной активности нейтрофильных гранулоцитов квантовыми точками / **Михеева Э.Р.** // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2011», секция «Биология». Москва. – 2011. – с. 26.
26. Михеева Э.Р. Влияние квантовых точек на выживаемость нейтрофилов / **Михеева Э.Р.**, Плескова С.Н., Горшкова Е.Н., Пудовкина Е.Е. // Сборник тезисов 15 Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино. – 2011. – с. 194.
27. Elza Mikheeva Difference kind morphology of pseudopodia neutrophil in phagocytosis of bacteria and xenobiotics investigated by atomic force microscopy / **Elza Mikheeva**, Svetlana Pleskova, Ekaterina Gorshkova // Fourth international meeting on AFM in Life sciences and Medicine Paris, France. – 2011. – p.85.
28. Плескова С.Н. Взаимодействие нативных клеток крови с наноразмерными флюорофорами / Плескова С.Н., **Михеева Э.Р.**, Горшкова Е.Н. // Сборник тезисов 5 международной конференции «Современные достижения бионаноскопии». Москва. – 2011. – с. 39.
- Статьи в региональных изданиях и материалах конференций:**
29. Гиматдинова Э.Р. Цитологический эффект квантовых точек на нейтрофильные гранулоциты / **Гиматдинова Э.Р.**, Князев Д.И., Плескова С.Н., Балалаева И.В., Гущина Ю.Ю. // XIII Нижегородская сессия молодых ученых. Естественно-научные дисциплины. Нижний Новгород. – 2008. – с. 11.
- 30 Куценко О.В. Применение полупроводниковых квантовых точек для анализа функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов / Куценко О.В., **Гиматдинова Э.Р.** // XIV Нижегородская сессия молодых ученых. Естественно-научные дисциплины. Нижний Новгород. – 2009. – с. 134-135.
- 31 Михеева Э.Р. Ингибирование защитных реакций нейтрофильных гранулоцитов в системе с квантовыми точками и нанопорошком Er/Yb / **Михеева Э.Р.**, Горшкова Е.Н. // Материалы III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010». Нижний Новгород. – 2010. – с. 179.
- 32 Пудовкина Е.Е. Исследование влияния квантовых точек на лизосомально-катионные белки нейтрофильных гранулоцитов / Пудовкина Е.Е., **Михеева Э.Р.**, Горшкова Е.Н. // «Биосистемы: организация, поведение и управление». Материалы 62-й и 63-й студенческих научных конференций биологического факультета. Нижний Новгород. – 2010. – с. 70-71.
- 33 Михеева Э.Р. Применение цитохимических тестов для оценки воздействия полупроводниковых нанокристаллов на нейтрофильные гранулоциты / **Михеева Э.Р.**, Горшкова Е.Н., Плескова С.Н., Пудовкина Е.Е. // XV Нижегородская сессия молодых ученых. Труды молодых ученых по естественнонаучным дисциплинам, Нижний Новгород. – 2010. – с. 18-19.

- 34 Горшкова Е.Н. Цитотоксический эффект наноразмерных флюорофоров с ионами Er/Yb оцененный по их влиянию на цитохимические реакции нейтрофильных гранулоцитов / Горшкова Е.Н., Плескова С.Н., **Михеева Э.Р.** // Сборник материалов четвертой всероссийской конференции по наноматериалам «НАНО-2011». Москва. – 2011. – с. 50.
- 35 Канунов А.Е. Разработка люминесцентных материалов на основе ортофосфатов структурного типа $\text{NaZr}_2(\text{PO}_4)_3$ для исследования живых систем / Канунов А.Е., Горшкова Е.Н., **Михеева Э.Р.** // Тезисы докладов V Всероссийской конференции студентов и аспирантов «Химия в современном мире». Санкт-Петербург. – 2011. – с. 181-182.
36. Михеева Э.Р. Накопление квантовых точек лейкоцитарной фракцией крови / **Михеева Э.Р.**, Плескова С.Н., Горшкова Е.Н., Пудовкина Е.Е. // Материалы IV Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2011». Воронеж. – 2011. – Т. 2. – с. 38-40.
37. Горшкова Е.Н. Атомно-силовая микроскопия для исследования изменений в морфологии нейтрофилов под воздействием вносимых наноразмерных флюорофоров / Горшкова Е.Н., Плескова С.Н., **Михеева Э.Р.** // Сборник материалов XVII Российского симпозиума по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел «РЭМ-2011». Черноголовка. – 2011. – с. 236.
38. Михеева Э.Р. Применение атомно-силовой микроскопии для оценки изменения упругости мембран нейтрофильных гранулоцитов под воздействием квантовых точек / **Михеева Э.Р.**, Плескова С.Н., Горшкова Е.Н. // Сборник материалов XVII Российского симпозиума по растровой электронной микроскопии и аналитическим методам исследования твердых тел «РЭМ-2011». Черноголовка. – 2011. – с. 253.
39. Михеева Э.Р. ингибирование защитных реакций нейтрофильных гранулоцитов в системе с квантовыми точками и нанопорошком Er/Yb / Михеева Э.Р., Горшкова Е.Н. // Сборник тезисов III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010». Нижний Новгород. – 2010. – с. 179-180.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., профессору Плесковой С.Н., за возможность проведения экспериментов директору НОЦ ФТНС ННГУ, к.ф.-м.н. Горшкову О.Н., а также за совместные исследования м.н.с. Горшковой Е.Н., научному сотруднику IRCIMA Нежданову А.В., коллективу лаборатории биофотоники ИПФ РАН, в особенности к.б.н., н.с. Балалаевой И.В., коллективу лаборатории клеточных технологий и биофотоники ННГУ, в особенности к.б.н. Брилкиной А.А.