

Экспериментальное обоснование возможности применения эритроцитов в качестве модели при изучении мембраноповреждающего действия наночастиц

© 2020. В. А. Оборин¹, д. м. н., с. н. с., профессор,
Т. Я. Ашихмина^{1,2}, д. т. н., профессор, г. н. с., зав. лабораторией,

¹Вятский государственный университет,

610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36,

²Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 28,

e-mail: lazermkl@yandex.ru

Наноматериалы, нередко имеющие уникальные характеристики, в то же время содержат наночастицы, обладающие не только высокой проникающей способностью, но и в ряде случаев повышенной токсичностью, что может повлиять на состояние здоровья лиц, использующих такие материалы. Это необходимо учитывать как при применении новых форм материалов, содержащих наночастицы и наноматериалы, особенно в медицине и косметологии, так и в технологическом процессе на всех этапах их получения. Важным аспектом является экологическая проблема в местах расположения предприятий, где осуществляется получение наночастиц, являющихся составной частью новых наноматериалов. Такие производства должны иметь высокий уровень защиты от возможного попадания наночастиц в первую очередь в воздушную среду. В случае неконтролируемых возможных выбросов и сбросов наночастиц в окружающую среду могут возникнуть ситуации, значительно ухудшающие экологическую обстановку в местах нахождения таких предприятий.

В статье представлены результаты изучения взаимодействия наночастиц оксида алюминия (Al_2O_3) и наноструктурированного углеродного материала «Таунит» с эритроцитами крови человека, коровы, барана, морской свинки и белой крысы в условиях *in vitro*. Выявлено, что эритроциты млекопитающих, в том числе и человека, под воздействием исследуемых наночастиц, подвергаются гемолизу. Проведено сопоставление результатов оценки гемолизирующих свойств изученных наноматериалов и установлено, что выраженность гемолиза эритроцитов зависит от предварительного воздействия ультразвука на суспензию наночастиц, их концентрации и от видовой принадлежности эритроцитов. Полученные сведения свидетельствуют о возможности использования эритроцитов при изучении мембраноповреждающего действия различных наночастиц и наноматериалов, которые в последние годы широко применяются в различных отраслях промышленности, косметологии и медицине.

Ключевые слова: наноматериалы, наночастицы, мембраны, экология человека, эритроциты.

Experimental substantiation of the possibility of using red blood cells as a model for studying the membrane damaging effect of nanoparticles

© 2020. V. A. Oborin¹ ORCID: 0000-0002-6941-2201^{*}

T. Ya. Ashikhmina^{1,2} ORCID: 0000-0003-4919-0047^{*}

¹Vyatka State University,

36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,

²Institute of Biology of Komi Scientific Center of the Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences,

28, Kommunisticheskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

e-mail: lazermkl@yandex.ru

Nanomaterials, which often have unique characteristics, at the same time contain nanoparticles that have not only a high penetrating power, but also in some cases increased toxicity, which can affect the health of people using such materials. This should be taken into account when using new forms of materials containing nanoparticles and nanomaterials, especially in medicine and cosmetology, and in the technological process at all stages of their production. An important aspect is the environmental problem in the locations of enterprises where the production of nanoparticles, which are part of the new nanomaterials, is carried out. Such production facilities must have a high level of protection against possible ingress of

nanoparticles primarily into the air. In the case of uncontrolled possible emissions and discharges of nanoparticles into the environment, situations may arise that significantly worsen the environmental situation in the locations of such enterprises.

The paper presents the results of studying the interaction of alumina nanoparticles (Al_2O_3) and carbon nanostructured material "Taunit" with erythrocytes of human blood and blood of bovine, sheep, guinea pigs and white rats under conditions *in vitro*. It was revealed that the red blood cells of mammals, including man, under the influence of the studied nanoparticles undergo hemolysis. A comparison of the results of evaluation of hemolyzing properties of nanomaterials studied shows that the intensity of hemolysis of erythrocytes depends on preliminary ultrasound exposure to the nanoparticle suspension, their concentration, and species affiliation of erythrocytes. The findings indicate the possibility of the use of red blood cells in the study of the membrane-damaging effect of different nanoparticles and nanomaterials, which in recent years are widely used in various industries, cosmetics and medicine. This should be considered when addressing environmental issues for persons employed in the production of nanoparticles and nanomaterials.

Keywords: nanomaterials, nanoparticles, membranes, human ecology, erythrocytes.

Наночастицы – структуры, имеющие хотя бы один характерный размер в диапазоне 1–100 нм, обладают уникальными свойствами такими, как высокая поверхностная энергия, устойчивая сорбция биологическими молекулами, наличие магнитных свойств [1]. Благодаря своим размерам, сопоставимым с размерами клеток (10–100 мкм), вирусов (20–450 нм), белков (5–50 нм), наночастицы могут приближаться к биообъекту, взаимодействовать и связываться с ним [2].

Область применения наноматериалов расширяется по мере выполнения фундаментальных и прикладных исследований. Медицинское и биологическое использование наноматериалов открывает широчайшие возможности в области целевой доставки активных лекарственных веществ, создания новейших методов и средств лечения на нанометровом уровне, медицинских имплантатов, диагностики *in vivo* и *in vitro* [1, 2]. Применение наночастиц, как носителей лекарств, может облегчить всасывание и прохождение их через биологические мембраны, защитить от метаболизма, улучшить профиль тканевого распределения и усилить проницаемость в клетку. Вследствие этого существенно повышается безопасность применения лекарств, уменьшаются их токсичность и риск развития побочных эффектов [3]. В то же время, материалы на их основе не могут не вызывать опасений в отношении их биологической совместимости и возможных негативных последствий взаимодействия с биологическими молекулами и живыми организмами в целом. Следовательно, перед тем как рекомендовать применение любых наноматериалов в каких-либо конкретных областях (промышленность, биотехнология, парфюмерия и, особенно, медицина), необходимо четкое понимание механизмов поведения наночастиц в биологических системах и детальное исследование различных аспектов их влияния на живой организм [4].

Биологические системы чрезвычайно сложны и взаимодействие наноструктур с клетками в целом и их отдельными компонентами (молекулы нуклеиновых кислот, белков), приводят к их уникальному распределению в тканях организма [5, 6], возможному иммунному ответу [7] и изменениям в метаболизме [8]. В литературе имеются противоречивые сведения о токсичности одной из молекулярных форм углерода – фуллеренов [6–9]. В ряде работ установлены ярко выраженные цито- и генотоксические свойства фуллеренов [10–12]. В работе [13] выявлен довольно высокий уровень цитотоксичности многослойных нанотрубок – другой аллотропной модификации углерода. Установлено, что токсический эффект, вызываемый металлическими и оксидными наночастицами, зависит от их размеров: более токсичны частицы меньшего размера. Показано, что молекулы ДНК в клетке разрушаются при облучении светом в присутствии наночастиц TiO_2 [14]. В работе [13] изучено воздействие наночастиц оксида титана на клетки BV2, вырабатывающие активные формы кислорода. В исследованиях [14] было проведено изучение цитотоксических свойств широкого круга металлооксидных наночастиц (диаметр 500–3000 нм) по отношению к фибробластам (клетки инкубировали в присутствии наночастиц в течение 24 ч).

Таким образом, анализ данных литературы показал, что наночастицы обладают выраженной цито- и генотоксичностью в отношении различных эукариотических клеток. Имеются работы по изучению способности наночастиц проникать через биологические мембраны и взаимодействовать с их макромолекулами. При этом эффект воздействия наночастиц на биологические мембраны оценивался по токсическому или биологическому эффектам на различные клетки в культурах тканей [2, 4, 10, 11, 14].

По нашему мнению, наиболее привлекательной моделью при изучении влияния

наночастиц на мембраны клеток являются эритроциты. Это связано с простотой их выделения из крови и не требует использования дорогостоящего оборудования.

Мембрана составляет всего 1% от массы эритроцита, но именно она определяет гомеостаз и функциональное состояние клетки и, в случае её повреждения, часть гемоглобина выходит наружу, что проявляется в изменении цвета плазмы крови. Зрелый эритроцит человека не содержит ядра и органелл, которые он утрачивает в процессе развития. Следовательно, эта клетка крови теряет способность к регенерации в случае её повреждения.

Цель настоящей работы – изучить возможность использования эритроцитов в качестве модели для изучения мембраноповреждающего действия различных наночастиц.

Материалы и методы исследований

Наночастицы. В ходе настоящей работы использовали наночастицы оксида алюминия (Al_2O_3), полученные в ООО «Нанокорунд» (г. Саров Нижегородской области) с размерами частиц 80–100 нм и наноструктурированный углеродный материал «Таунит», представляющий собой переплетённые нити диаметром 40–50 нм.

Биоматериал. Материалом для получения эритроцитов служила венозная кровь клинически здоровых людей и животных. Пробы крови людей получали в Государственном учреждении здравоохранения «Кировская областная станция переливания крови», пробы крови животных – из вивария Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Вятская государственная сельскохозяйственная академия» (коровы, бараны). В качестве антикоагулянтов применяли 3,8%-ный раствор лимоннокислого натрия (1:10) или гепарин (3,0 ЕД/мл крови).

В исследованиях использовали эритроциты крови, которые хранились не более одних суток. Приготовление суспензии эритроцитов для оценки мембраноповреждающего действия наночастиц осуществляли следующим образом. Первоначально эритроциты трижды отмывали десятикратным объёмом стерильного 0,9% раствора хлорида натрия (рН 7,2 ед.) путём центрифугирования при 1000 об./мин в течение 5 мин, а затем ресуспендировали в этом же растворе до первоначального объёма.

Определение оптической плотности жидкостей (суспензий) осуществляли на фотоэлек-

трическом концентрационном колориметре КФК-2 при длине волны проходящего света 540 нм, длине оптического пути кюветы 5 мм и рабочем объёме кюветы 2,3 мл.

Для изучения способности наночастиц Al_2O_3 повреждать мембраны эритроцитов использовали методический приём, основанный на выходе гемоглобина при повреждении мембран эритроцитов в результате их совместного нахождения с наночастицами. Наблюдаемый при этом гемолиз можно регистрировать, фиксируя изменение цвета надосадочной жидкости после предварительного центрифугирования суспензии эритроцитов с изучаемыми наночастицами.

Методика оценки воздействия наночастиц на мембраны эритроцитов заключалась в следующем: в пробирку, содержащую 10,0 мл 0,9% раствора хлорида натрия, вносили 1,0 г порошка наночастиц Al_2O_3 , тщательно перемешивали и подвергали ультразвуковой дезинтеграции в течение 30 мин. Затем к 3,0 мл суспензии эритроцитов различной концентрации добавляли 20,0 мкл суспензии исследуемых наночастиц. Взвесь эритроцитов и наночастиц тщательно перемешивали на вращающейся платформе в течение 1 мин при комнатной температуре, после чего эритроциты осаждали при 1000 об./мин в течение 5 мин и измеряли интенсивность окраски надосадочной жидкости.

Контролем служили пробы, в которых к эритроцитам добавляли 20,0 мкл 0,9% раствора хлорида натрия.

Статистическую обработку результатов выполняли при помощи компьютерной программы «Biostat» версии 4.03 с вычислением значений средней арифметической (M), ошибки средней арифметической (m), коэффициента достоверности (p) и корреляционной зависимости (r). Достоверность различий между группами оценивали с использованием t -критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований изучили способность наночастиц Al_2O_3 повреждать мембраны эритроцитов. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Установлено, что при используемых концентрациях эритроцитов интенсивность окраски надосадочной жидкости в опытных пробах достоверно превышала таковую контрольных проб. Следовательно, частицы Al_2O_3 вызывали частичный выход гемоглобина из клеток в

Таблица 1 / Table 1

Оценка влияния наночастиц оксида алюминия на гемолиз эритроцитов человека
Assessment of the effect of aluminum oxide nanoparticles on human red blood cell hemolysis

Проба Sample	Интенсивность окраски надосадочной жидкости (в единицах экстинкции) при концентрации эритроцитов ... · 10 ⁶ тыс./мл (M±m; n = 5) The color intensity of the supernatant (in units of extinction) at a concentration of red blood cells... · 10 ⁶ thous./mL (M±m; n = 5)				
	4,0	2,0	1,0	0,5	0,25
Опыт Experiment	0,22±0,01*	0,17±0,015*	0,16±0,01*	0,095±0,02*	0,095±0,01*
Контроль Control	0,09±0,02	0,07±0,02	0,04±0,01	0,03±0,015	0,03±0,01

Примечание: * – различия статистически достоверны по сравнению с контролем при p < 0,05.
Note: * – differences are statistically significant compared to control at p < 0.05.

Таблица 2 / Table 2

Оценка воздействия различных концентраций наночастиц Al₂O₃ на уровень гемолиза эритроцитов человека / Assessment of the impact of different concentrations of aluminum oxide nanoparticles on the level of human erythrocyte hemolysis

Проба Sample	Интенсивность окраски надосадочной жидкости в пробах (в единицах экстинкции) с концентрацией наночастиц ... мкг/мл (M±m; n = 5) The color intensity of the supernatant in the samples (in units of extinction) with a concentration of nanoparticles ... µg/mL (M±m; n = 5)				
	100,0	50,0	25,0	12,5	6,3
Опыт Experiment	0,20±0,01	0,20±0,02	0,16±0,01	0,09±0,01	0,04±0,02
Контроль Control	0,03±0,01	0,04±0,015	0,03±0,02	0,03±0,01	0,04±0,01

среду инкубации, что свидетельствует о повреждении мембран эритроцитов. Выявлено, что степень гемолиза зависит от количества эритроцитов. Наиболее выраженный гемолиз наблюдался при концентрации эритроцитов 1,0 · 10⁶ тыс./мл. При этом в опытной пробе оптическая плотность надосадочной жидкости была в 4 раза выше, чем в контрольной пробе. Поэтому данную концентрацию эритроцитов использовали в дальнейших опытах.

В последующем изучили воздействие различных концентраций наночастиц на мембраны эритроцитов. Для этого в пробирки с эритроцитами вносили различные концентрации наночастиц Al₂O₃ после их предварительной дезинтеграции ультразвуком. Результаты этих исследований приведены в таблице 2.

Из данных таблицы 2 видно, что повреждающее действие на мембраны эритроцитов напрямую зависит от концентрации наночастиц оксида алюминия. Наиболее выраженный повреждающий эффект наблюдается при концентрации наночастиц в концентрации 100,0 мкг/мл. Поэтому в следующих экспериментах продолжили использовать суспензию частиц оксида алюминия в этой концентрации.

Далее были проведены сравнительные эксперименты с наночастицами «Таунита» и Al₂O₃ после их предварительной ультразвуковой дезинтеграции (опыт) и без неё (контроль) (табл. 3).

Как показал эксперимент, гемолитическим эффектом обладали лишь частицы Al₂O₃ и углерода, подвергнутые предварительной

Таблица 3 / Table 3

Сравнительные данные о влиянии наночастиц Al₂O₃ и «Таунита» на гемолиз эритроцитов
Comparative data on the effect of nanoparticles aluminium oxide and "Taunit" on hemolysis of erythrocytes

Вид наночастиц Type of nanoparticles	Интенсивность окраски надосадочной жидкости проб, в единицах экстинкции (M±m; n = 5) / The color intensity of the supernatant samples, in units of extinction (M±m; n = 5)	
	опыт / experiment	контроль / control
Al ₂ O ₃	0,16±0,01	0,03±0,01
C	0,21±0,02	0,05±0,01

Таблица 4 / Table 4

Сравнительные данные о влиянии наночастиц Al_2O_3 и «Таунита» на гемолиз эритроцитов млекопитающих (отмытых и находящихся в крови)
Comparative data on the effect of aluminum oxide and “Taunit” nanoparticles on the hemolysis of mammalian red blood cells (washed and stored in the blood)

Эритроциты Erythrocyte	Интенсивность окраски надосадочной жидкости в пробах, в единицах экстинкции ($M \pm m; n = 5$) The color intensity of the supernatant in the samples, in units of extinction ($M \pm m; n = 5$)							
	наночастицы оксида алюминия aluminum oxide				наночастицы Таунита Taunit			
	отмытые эритроциты washed red blood cells		эритроциты в крови red blood cells in the blood		отмытые эритроциты washed red blood cells		эритроциты в крови red blood cells in the blood	
	опыт experiment	контроль control	опыт experiment	контроль control	опыт experiment	контроль control	опыт experiment	контроль control
Человека Human	0,20±0,01	0,05±0,03	0,15±0,01	0,1±0,03	0,2±0,01	0,05±0,03	0,12±0,02	0,10±0,03
Белой крысы White rat	0,23±0,03	0,09±0,02	0,13±0,01	0,12±0,01	0,3±0,02	0,09±0,02	0,18±0,01	0,12±0,01
Морской свинки Guinea pig	0,18±0,01	0,09±0,04	0,16±0,02	0,12±0,01	0,22±0,02	0,09±0,04	0,13±0,01	0,12±0,01
Коровы Cow	0,27±0,01	0,1±0,01	0,19±0,01	0,15±0,01	0,25±0,01	0,10±0,01	0,16±0,03	0,15±0,01
Барана Sheep	0,20±0,01	0,1±0,01	0,14±0,01	0,12±0,01	0,19±0,01	0,10±0,01	0,12±0,01	0,12±0,01

обработке ультразвуком. Это, вероятно, обусловлено тем, что ультразвук осуществляет дезинтеграцию наночастиц и приводит их в более активное состояние.

На заключительном этапе исследований нами проведены сравнительные эксперименты по изучению влияния наночастиц Al_2O_3 и «Таунита» на эритроциты, помещённые в физиологический раствор хлорида натрия и эритроциты, находящиеся непосредственно в крови различных млекопитающих (табл. 4).

Из данных, приведённых в таблице 4, следует, что Al_2O_3 и «Таунит» обладают мембраноповреждающим действием в отношении эритроцитов различных млекопитающих. При этом выявлены отличия повреждающего действия этих частиц на эритроциты различных видов млекопитающих. Наиболее выраженным действием изученные наночастицы обладают в отношении эритроцитов человека и меньшее действие они проявляют по отношению к эритроцитам коровы и барана. Кроме того, установлено, что эритроциты, находящиеся непосредственно в крови, практически не повреждаются изученными наночастицами. Это можно объяснить тем, что на мембране эритроцитов находится большое количество белков, которые «экранируют» её от непосредственного воздействия наночастиц.

Заключение

Таким образом, показана принципиальная возможность использования эритроцитов млекопитающих для изучения воздействия наночастиц на их мембраны. На основании проведённых исследований предложена методика, в основу которой заложен принцип гемолитического действия испытуемых наночастиц на эритроциты. В результате экспериментов показано, что уровень повреждающего действия наночастиц на мембраны эритроцитов зависит от предварительной обработки суспензии наночастиц ультразвуком, их концентрации, а также от разновидности наночастиц. Предлагаемая методика может использоваться для оценки влияния различных наночастиц на мембраны эритроцитов человека и других видов млекопитающих. Методика проста в исполнении, не требует дорогостоящего оборудования, результаты исследований воздействия наночастиц на мембраны эритроцитов оцениваются с помощью прибора, что значительно повышает их информативность. Предлагаемая методика может быть использована для определения мембраноповреждающего действия наноматериалов, используемых в различных областях промышленности, косметологии и медицине, что позволит обеспечить экологию.

гическую безопасность лиц, участвующих в производстве наночастиц и наноматериалов.

References

1. Couvreur P., Vauhier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease // *Pharmaceut. Res.* 2006. V. 23. P. 1417–1450. doi: 10.1007/s11095-006-0284-8
2. Chen Z., Meng H.A., Xing G.M. Acute toxicological effects of copper nanoparticles *in vivo* // *Toxicology Letters.* 2006. No. 163. P. 109–120. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.10.003
3. Bharali D.J., Klejbor I., Stachowiak E.K., Dutta P., Roy I., Kaur N., Bergey E.J., Prasad P.N. Organically modified silica nanoparticles: A nonviral vector for *in vivo* gene delivery and expression in the brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 11539–11544. doi: 10.1073/pnas.0504926102
4. Panessa-Warren B.J., Maye M.M., Warren J.B., Crosson K.M. Single walled carbon nanotube reactivity and cytotoxicity following extended aqueous exposure // *Environ Pollut.* 2009. V. 157. No. 4. P. 1140–1151. doi: 10.1016/j.envpol.2008.12.028
5. Hall J.B., Dobrovolskaia M.A., Patri A.K. Characterization of nanoparticles for therapeutics // *Nanomed.* 2007. No. 2. P. 789–803. doi: 10.2217/17435889.2.6.789
6. Geze A., Chau L.T., Choisnard L. Biodistribution of intravenously administered amphiphilic beta-cyclodextrin nanospheres // *Int. J. Pharm.* 2007. No. 344. P. 135–142. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.06.050
7. Kagan V.E., Bayir H., Shvedova A.A. Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin // *Nanomedicine.* 2005. No. 1. P. 313–316. doi: 10.1016/j.nano.2005.10.003
8. Becker M.L., Bailey L.O., Wooley K.L. Peptide-derivatized shell-cross-linked nanoparticles. Biocompatibility evaluation // *Bioconjug. Chem.* 2004. No. 15. P. 710–717. doi: 10.1021/bc049945m
9. Roberts J.E., Wielgus A.R., Boyes W.K., Zhao B.N., Chignell C.F., Hu D.N. Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human lens epithelial cells // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008. V. 228. P. 49–58. doi: 10.1016/j.taap.2007.12.010
10. Sayes C.M., Marchione A.A., Reed K.L., Warheit D.B. Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity *in vivo* in contrast to *in vitro* proles // *Nano. Lett.* 2007. V. 7. P. 2399–2406. doi: 10.1021/nl0710710
11. Raja P.M., Connolley J., Ganesan G.P. Impact of carbon nanotube exposure, dosage and aggregation on smooth muscle cells // *Toxicol. Lett.* 2007. V. 169. P. 51–63. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.12.003
12. Yang X.L., Fan C.H. Photo-induced cytotoxicity of malonic acid [C₆₀] fullerene derivatives and its mechanisms // *Toxicol. in vitro.* 2002. V. 16. P. 41–46. doi: 10.1016/s0887-2333(01)00102-3
13. Long T., Saleh N., Tilton R.D., Lowry G.V., Veronesi B. Titanium dioxide (P25) produced reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity // *Environ Sci. Technol.* 2006. V. 40. P. 4346–4352. doi: 10.1021/es060589n
14. Li N., Sioutas C., Schmitz D., Misra C., Sempf J., Wang M., Oberley T., Froines J., Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage // *Environ. Health Perspect.* 2003. V. 111. P. 455–460. doi: 10.1289/ehp.6000