

6. Kreuer, K. D. On the development of proton conducting polymer membranes for hydrogen and methanol fuel cells / K. D. Kreuer // J. Membrane Sci. – 2001. – Vol. 185. – P. 29–39.
7. Jinjun Shi, Composite Membranes for Proton Exchange Membrane Fuel Cells: / Dissertation Doctor of Philosophy: 27.02.2008 / Jinjun Shi – Dayton, United States – 2008. – P. 127.
8. Сергейченко, А. В. Программное обеспечение для определения свободной поверхностной энергии твердых тел / А. В. Сергейченко, Г. Б. Мельникова, С. А. Чижик // Приборостроение-2009 : материалы 2-й Междунар. науч.-техн. конф., Минск, 11–13 нояб. 2009 г. / БНТУ ; редкол. : О. К. Гусев [и др.]. – Минск, 2009. – С. 225–226.
9. Melnikova, G. B. Structure and mechanical properties of ultrafiltration membranes modified with Langmuir–Blodgett films / G. B. Melnikova [et al.] // Petroleum Chemistry. – 2016. – V. 55, Is. 5. – P. 406–412.
10. Должникова, В. Д. О строении адсорбционного слоя поверхностно-активных веществ на границе раствор – твердое тело / В. Д. Должникова, Б. Д. Сумм // Вестн. Моск. гос. ун-та. Сер. 2. Химия. – 1998. – Т. 39. – № 6. – С. 408–412.

УДК [576.31+539.31]:539.25

КОМПЛЕКСНОЕ ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА КРЕМНИЯ И РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУР НА СВОЙСТВА МЕМБРАН КЛЕТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

Г. Б. Мельникова¹, А. С. Петровская¹, Т. Н. Толстая¹,
Е. Э. Константинова¹, О. Н. Шишко², С. А. Чижик¹

¹Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова НАН Беларуси,
Минск, Беларусь

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Представлены результаты исследования влияния комплексных воздействий различных температур и наночастиц оксида кремния на механические свойства эритроцитов и тромбоцитов методом атомно-силовой микроскопии. Установлено изменение агрегационных свойств клеток после инкубирования при повышенных температурах и с наночастицами.

Ключевые слова: структура мембран, эритроциты, тромбоциты, наночастицы оксида кремния, атомно-силовая микроскопия, модуль упругости, сила адгезии, скорость оседания эритроцитов.

Введение. На основании выявленных положительных эффектов наночастицы в современной медицине широко используются для направленной адресной доставки физиологически активных веществ, для обеспечения непосредственного усвоения гидрофобных веществ тканями организма. С целью защиты наночастиц от иммунных реакций применяют эритроциты в качестве транспортеров. Однако современными исследователями показано возможное негативное воздействие нанообъектов на функции организма [1]. Токсический эффект искусственных нанообъектов на биологические системы определяется

особыми физико-химическими свойствами, структурными особенностями и размерами наночастиц [2]. Установлено, что возможно проявление токсического эффекта при воздействии металлическими и оксидными наночастицами, величина которого зависит от их размеров и концентрации: большую токсичность проявляют частицы меньшего размера [3] и при более высоких концентрациях [4], экспериментально подтверждено разрушение молекул ДНК наночастицами оксида титана [5, 6]. На основании экспериментальных исследований изменения свойств тканей биологических моделей после перорального введения наночастиц оксида кремния сделаны выводы о возможных рисках для организма человека при использовании аморфных частиц (площадь поверхности 300 м²/г и выше) в качестве пищевой добавки, вспомогательного компонента в фармацевтических препаратах [7]. Внутримышечное введение наночастиц меди, железа и кобальта приводит к увеличению числа лейкоцитов, эритроцитов, концентрации гемоглобина и его среднего содержания в эритроците [8]. В исследованиях по изучению свойств эритроцитов в суспензии под действием нанодисперсного шунгитового углерода показано, что изменения формы эритроцитов имели необратимый характер, тогда как изменения степени агрегации клеток были обратимыми и наблюдались только в присутствии наноуглерода, что объясняется образованием комплексов наночастиц углерода с белками мембраны эритроцитов [9].

На основании сказанного выше, считаем, что проведение исследований по установлению механизмов взаимодействия и изменений свойств мембран клеток крови является актуальной задачей. Важным является установление изменений и закономерностей, происходящих с биологическими объектами на наноровне. Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) – один из перспективных и достаточно широко используемый метод для исследования биологических объектов.

Материалы и методы. В работе использованы клетки крови пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2). Средний возраст пациентов среди женщин составил $53,6 \pm 4,7$ лет, среди мужчин – $56,8 \pm 3,4$ года.

Эритроциты для исследований выделяли из стабилизированной венозной крови пациентов этилендиаминтриацетатом калия K₃ЭДТА (Sigma-Aldrich), фиксировали 0,5 %-ным раствором глутарового альдегида и наносили на подложки из слюды при температуре 20 ± 5 °С. Для выделения тромбоцитов венозную кровь стабилизировали 3,8 %-ным раствором цитрата натрия. Образцы крови также инкубировали с наночастицами диоксида кремния (Sigma-Aldrich, $d = 10\text{--}30$ нм) в физиологическом растворе с концентрацией частиц 0,2 и 1 мг/мл при температуре 41–47 °С с интервалом 2 °С в течение 40 и 60 мин. После окончания каждого из периодов выделяли эритроциты и тромбоциты, фиксировали 0,5 %-ным раствором глутарового альдегида на подложках из слюды для дальнейших проведенных исследований методом атомно-силовой микроскопии. Более подробно методика выделения и фиксации клеток описана в работе [10].

Изменение упругих характеристик клеточных мембран оценивали путем расчета модуля упругости по модели Джонсона–Кенделла–Робертса на основании полученных кривых «подвода – отвода» кантилевера от поверхности образца на атомно-силовом микроскопе NT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь) с использованием стандартных кремниевых зондов NSC 11, жесткость 3 Н/м («MikroMacsh»), радиус кривизны 50 нм.

Относительное изменение (δ_E) параметров E после комплексного воздействия наночастиц и температуры рассчитывали по формуле:

$$\delta_E = \frac{(E - E_{\text{исх}})}{E_{\text{исх}}},$$

где E – модуль упругости мембраны клетки после комплексного воздействия температур и наночастиц; $E_{\text{исх}}$ – модуль упругости исходных клеток.

Степень оседания эритроцитов (СОЭ) определяли по скорости их оседания в стандартизованных стеклянных капиллярах диаметром 3 и длиной 200 мм («Drager & Heerhorst GmbH & Co. ЛП», Германия) в течение 2 ч наблюдения [11].

Результаты и обсуждение. Методом атомно-силовой микроскопии оценено комплексное влияние наночастиц оксида кремния и температур на изменение структурных и механических свойств эритроцитов и тромбоцитов условно здоровых пациентов и с сахарным диабетом 2 типа (СД2). Учитываем значения, превышающие 20 %-ный порог изменения от исходных параметров, включающий 15 %-ную экспериментальную ошибку и 5 %-ный разброс значений локальных механических свойств мембран клетки, связанных с неоднородностью распределения свойств по поверхности.

Методом АСМ не установлено изменений структуры мембран клеток как здоровых пациентов, так и с СД2. Локальные механические свойства мембран эритроцитов и тромбоцитов условно здоровых пациентов после инкубирования с наночастицами и комплексного воздействия температуры и оксида кремния не изменяются в пределах 20 %.

Однако отмечается увеличение значений модуля упругости выше 20 % (рис. 1) мембран эритроцитов пациентов с СД2 после воздействия температуры 41 °С в течение 40 и 60 мин (концентрация $\text{SiO}_2 = 0,2$ мг/мл), а для тромбоцитов – в течение 60 мин (концентрация $\text{SiO}_2 = 1,0$ мг/мл), что подтверждает полученный нами ранее результат о более высокой термостабильности тромбоцитов по сравнению с красными клетками [12].

Полученные результаты по оседанию эритроцитов свидетельствуют об изменении скорости агрегации эритроцитов на второй стадии в случае инкубирования эритроцитов с наночастицами оксида кремния. С увеличением концентрации возрастают изменения данного параметра. В ряде случаев значения увеличивались в три раза. При этом на первой стадии характер изменения времени и скорости оседания эритроцитов пациентов с СД2 различен и зависит от биохимического состава крови.

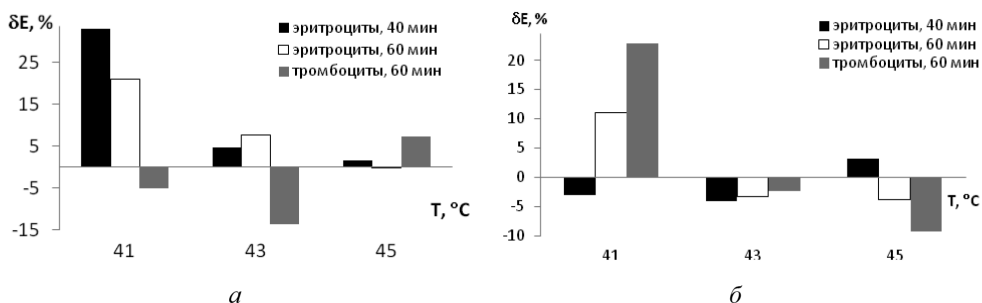


Рис. 1. Изменение значений модуля упругости (в % от относительно среднего значения E мембран клеток пациентов с СД2) после комплексного влияния температур и наночастиц оксида кремния: *а* – 0,2 мг/мл наночастиц оксида кремния в физиологическом растворе; *б* – 1,0 мг/мл

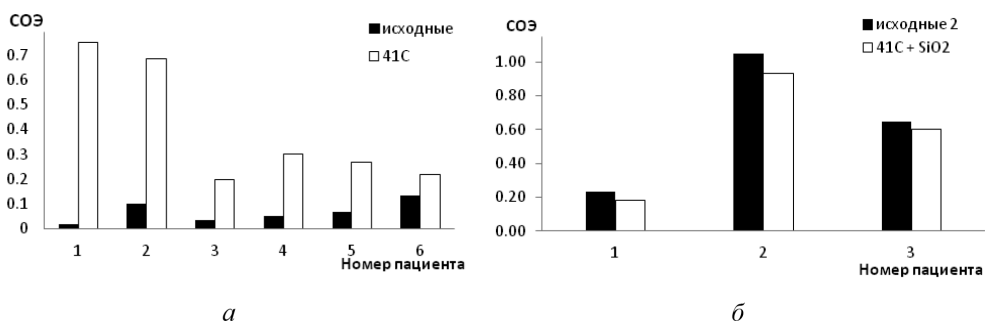


Рис. 2. Изменение скорости оседания эритроцитов после инкубирования при температуре 41 °С (*а*) и комплексного воздействия температур и наночастиц оксида кремния (*б*)

После инкубирования клеток при повышенных температурах показатель СОЭ увеличивался в 4–5 раз, что связано с понижением вязкости крови в данных условиях. Дополнительное введение раствора наночастиц оксида кремния привело к компенсации данных изменений и, как результат, – незначительному уменьшению значений скорости оседания эритроцитов по сравнению с исходными показателями. Предполагаем, что наблюдаемые эффекты связаны с взаимодействием наночастиц с мембраной клетки, возможно, встраиванием их в структуру мембраны клетки, и, как следствие, изменение поверхностного заряда, что является основным фактором в процессе агрегации эритроцитов. После инкубирования при температуре 45 °С наблюдается увеличение времени начального периода и резкий рост агрегации клеток на 80 мин наблюдения. Наиболее характерные изменения СОЭ после комплексного воздействия температур и наночастиц диоксида кремния представлены на диаграмме (рис. 2).

На основании данных АСМ и агрегации эритроцитов можно предположить о стабилизирующем действии наночастиц оксида кремния на изменения свойств мембран клеток после воздействия высоких температуры.

Заключение. Установленные закономерности могут быть использованы при установлении биохимических механизмов взаимодействия компонентов клеточной мембраны с функциональными группами химических соединений, а также процессов, протекающих при различных клеточных патологиях.

Работа выполнена в рамках ГПНИ «Энергетические системы, процессы и технологии», задание Энергетические системы, процессы и технологии – 2.2.

Литература

1. Chambers, E. Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells: mechanism and extended circulation / E. Chambers, S. Mitragotri // *Exper. Biology and medicine*. – 2007. – V. 232. – P. 958–966.
2. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage / N. Li [et al.] // *Environ. Health Perspect.* – 2003. – V. 11, № 4. – P. 455–460.
3. Андреев, Г. Б. Материалы, производимые по нанотехнологиям: потенциальный риск при получении и использовании / Г. Б. Андреев [и др.] // *Рос. хим. жур. им. Д. И. Менделеева*. – 2008. – Т. LII, № 5. – С. 32–38.
4. Cytotoxicities of oxides, phosphates and sulfides of metal [Text] / T. Hanava [et al.] // *Biomaterials*. – 1992. – V. 13. – P. 20–24.
5. Interaction between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro / M. R. Wilson [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2002. – V. 184. – P. 172–179.
6. Влияние наночастиц железа на дыхательную функцию крови / М. Ю. Скоркина [и др.] // *Ярославский педагогический вестник*. – 2010. – № 3. – С. 75–78.
7. Impact of silica dioxide nanoparticles on the morphology of internal organs in rats by oral supplementation / N. V. Zaitseva [et al.] // *Health Risk Analysis*. – 2016. – N. 4. – P. 74–87.
8. Яушева, Е. В. Оценка влияния наночастиц металлов на морфологические показатели периферической крови животных / Е. В. Яушева, С. А. Мирошников, О. В. Кван // *Вестник ОГУ*. – 2013. – № 12 (161). – С. 203–207.
9. Морфология и агрегация эритроцитов в нанодисперсиях углерода / А. С. Горюнов [и др.] // *Труды Карельского научного центра РАН*. – 2009. – № 3. – С. 30–37.
10. Influence of polyacrylic acid nanoparticles on the elastic properties of RBCs membranes in patients with diabetes mellitus type 2 / G. B. Melnikova [et al.] // *Series on Biomechanics*. – 2015. – V. 29, № 4. – P. 12–19.
11. ISCH recommendation for measurements of erythrocyte sedimentation rate // *J. Clin. Pathol.* – 1993. – 46 (3). – P. 198–203.
12. Исследование влияния температуры на структурно-механические свойства мембраны эритроцитов и тромбоцитов методом атомно-силовой микроскопии / Г. Б. Мельникова [и др.] // *Сборник докладов XII Международной конференции «Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии»*: Минск, 18–21 октября 2016 г. – С. 206–210.