

УДК 57.085.25:549.731.13-022.532

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-157-167>

Для цитирования: Торопова Я.Г., Печникова Н.А., Зелинская И.А., Королев Д.В., Гареев К.Г., Маркитантова А.С., Богусhevская В.Д., Поволоцкая А.В., Маньшина А.А. Изучение гемосовместимости магнитных наночастиц магнетита и композитных частиц магнетита-кремнезема *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2018; 17 (3): 157–167.

## Изучение гемосовместимости магнитных наночастиц магнетита и композитных частиц магнетита-кремнезема *in vitro*

Торопова Я.Г.<sup>1</sup>, Печникова Н.А.<sup>1, 2</sup>, Зелинская И.А.<sup>1, 3</sup>, Королев Д.В.<sup>1, 3</sup>, Гареев К.Г.<sup>4</sup>, Маркитантова А.С.<sup>5</sup>, Богусhevская В.Д.<sup>5</sup>, Поволоцкая А.В.<sup>6</sup>, Маньшина А.А.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Национальный федеральный медицинский исследовательский центр (НМИЦ) им. В.А. Алмазова Россия, 194156, г. Санкт-Петербург, пр. Пархоменко, 15б

<sup>2</sup> Санкт-Петербургская государственная химико-фармакологическая академия Россия, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14а

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики Россия, 197101, г. Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

<sup>4</sup> Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет (СПбГЭУ) «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина) Россия, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 5

<sup>5</sup> Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого Россия, 195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

<sup>6</sup> Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ) Россия, 198504, г. Санкт-Петербург, Петергоф, ул. Ульяновская, 5

### РЕЗЮМЕ

Целью данного исследования явилось изучение гемосовместимости магнитных наночастиц (МНЧ) в модельных системах *in vitro*.

**Материалы и методы.** В работе использованы коллоидные растворы наночастиц магнетита (МНЧ1) и композитных частиц магнетита-кремнезема (МНЧ2) в 0,9%-м растворе NaCl в концентрациях 0,2; 2,0 и 20,0 мг/мл. Исследование проводили на гепаринизированной цельной крови человека, для чего к 1 мл крови добавляли 1 мл раствора наночастиц или физиологического раствора (контроль). Измерения проводили непосредственно после приготовления смеси через 1; 2,5 и 5 ч. Количество активных форм кислорода (АФК) детектировали с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ), вычисляли индекс агрегации эритроцитов, для оценки гемолитических свойств рассчитывали коэффициент гемоллиза на основе показателей оптической плотности плазмы, исследование белкового слоя на поверхности наночастиц производили при помощи ИК-Фурье спектроскопии.

**Результаты.** Установлено, что наночастицы обоих типов в концентрации 0,2 и 20,0 мг/мл усиливают ХЛ непосредственно после введения и подавляют ее в ходе инкубации, при этом эффект усиливается с увеличением концентрации и времени воздействия. Также отмечено увеличение агрегационной устойчивости эритроцитов, однако с повышением дозы и времени воздействия наблюдался значительный гемоллиз. ИК-Фурье спектроскопия показала оседание альбумина на поверхности МНЧ, который меняет свою конформацию с течением времени.

✉ Торопова Яна Геннадьевна, e-mail: yana.toropova@mail.ru.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о безопасности данных МНЧ по исследованным параметрам в низких концентрациях (0,2 и 2,0 мг/мл) при взаимодействии до 2,5 ч. Это позволяет рассматривать данные агенты как перспективные средства для дальнейшего использования в медицинской практике после завершения исследований в отношении других показателей гомеостаза.

**Ключевые слова:** магнитные наночастицы, гемосовместимость, хемилюминесценция, агрегация эритроцитов, гемолиз, «белковая корона», ИК-Фурье спектроскопия.

## ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день активно ведутся разработки наночастиц для биомедицинских применений, таких как адресная доставка лекарств, индукция локальной гипертермии, клеточная маркировка и доставка генов и т.д. Отдельное место в широком спектре наночастиц занимают магнитные наночастицы (МНЧ), а именно наноразмерные частицы оксида железа, что обусловлено их уникальными химическими, биологическими и магнитными характеристиками, обеспечивающими их многофункциональность. Так, магнитные наночастицы могут быть сконцентрированы в определенной зоне с помощью местного применения внешнего магнитного поля, обеспечивая целевую доставку фармакологических агентов. Кроме того, они могут быть использованы в качестве теплогенерирующих систем для гипертермического воздействия (например, на опухоль) [1, 2]. Существует возможность использования МНЧ в качестве диагностического агента (магнитно-резонансная диагностика) [3].

Наночастицы, разрабатываемые для использования в организме человека, требуют тщательного изучения их биосовместимости, в том числе в случае предполагаемого введения наночастиц в системный кровоток, исследования их гемосовместимости, что позволяет сделать выводы о возможности их использования *in vivo*.

Известно, что механизмы биологического действия и оказываемые эффекты в значительной степени определяются физико-химическими характеристиками наночастиц, которые зависят от способа получения, наличия оболочки и ее качественного состава.

Одним из широко применяемых способов получения наночастиц на основе оксида железа в настоящее время является золь-гель метод, позволяющий синтезировать наночастицы с заданной формой и размерами, а также создавать магнитные композиты этих частиц, интегрированных в объем или на поверхность диэлектрической аморфной матрицы диоксида кремния. Использование оболочки позволяет обеспечить

стабилизацию МНЧ, упростить их дальнейшую функционализацию и конъюгацию с белками, ферментами, антителами, лекарственными препаратами, а также повысить их биосовместимость [4, 5].

Целью исследования явилось изучение гемосовместимости магнитных наночастиц магнетита и композитных частиц магнетита-кремнезема в модельных системах *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Приготовление исследуемых агентов.* В работе использованы наночастицы магнетита (МНЧ1) и композитные частицы магнетита-кремнезема (МНЧ2), синтез и физико-химические свойства которых подробно описаны ранее [6]. Приготовление коллоидного раствора наночастиц в 0,9%-м растворе хлорида натрия (физиологическом растворе (ФР)) осуществлялось на ультразвуковом диспергаторе УЗД-2 (Ультразвуковая техника, Россия) в течение 5 мин.

*Краткая характеристика МНЧ1 и МНЧ2.* Основными различающимися параметрами, влияющими на биологические свойства наночастиц, являются средний гидродинамический радиус ( $> 1\ 000$  нм для МНЧ1 и 75 нм для МНЧ2), форма и размеры (игольчатые МНЧ1 средней шириной 10 нм и средней длиной 43 нм, различные по форме МНЧ2 размером 5–15 нм, образующие сферические агрегаты 100–200 нм). Кроме того, МНЧ2 имеют оболочку из диоксида кремния.

*Исследование гемосовместимости магнитных наночастиц.* Для оценки гемосовместимости проводили исследование влияния наночастиц на продукцию активных форм кислорода, агрегативную устойчивость эритроцитов, спонтанный гемолиз, а также изучали процесс формирования белкового слоя на поверхности наночастиц (играющего центральную роль в гемосовместимости наноструктур).

Для выявления дозозависимости оказываемых эффектов исследовали МНЧ в концентрациях 0,2; 2,0 и 20,0 мг/мл. Объем выборки ( $n$ ) в каждой из исследуемых групп – восемь образцов.

Исследование проводили на гепаринизированной цельной крови человека, для чего готовили инкубационную взвесь: к 1 мл крови при постоянном перемешивании добавляли 1 мл раствора исследуемых магнитных наночастиц.

Полученную взвесь инкубировали при 37 °С при постоянном перемешивании на возвратно-поступательном шейкере (Heidolph, Германия) при 200 об./мин. Контролем служили образцы крови с добавлением эквивалентного объема физиологического раствора (ФР, группа ФР).

Регистрацию исследуемых показателей осуществляли непосредственно после добавления наночастиц или ФР к образцам крови (исходный уровень), а также через 1; 2,5 и 5 ч инкубации при постоянном перемешивании (200 об./мин). Регистрацию изучаемых параметров в каждом образце на каждой дискретной точке осуществляли в трехкратных повторях.

*Оценка генерации активных форм кислорода.* Продукцию активных форм кислорода детектировали с помощью метода люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) на хемилюминометре Lum-5773 (ДИСофт, Россия). С целью измерения ХЛ каждого образца к 200 мкл инкубационной взвеси добавляли 600 мкл раствора Хэнкса и 200 мкл раствора люминола, приготовленного добавлением 200 мкл диметилсульфоксида (DMSO) к твердому люминолу (0,002 г) и доведенного до 10 мл дистиллированной водой. В течение 10 мин после введения люминола регистрировали максимальную интенсивность  $I_{max}$  и полную светосумму  $S$  свечения за данный промежуток времени. Из регистрируемых значений хемилюминесценции вычитали фоновое свечение хемилюминометра.

*Оценка спонтанной агрегации эритроцитов цельной крови.* Перед проведением исследования под дно пробирки на 3 мин устанавливали постоянный магнит для изоляции МНЧ из взвеси. Для анализа производили забор образца из нижнего слоя осевших за 3 мин эритроцитов. Для каждого образца вычисляли индекс агрегации эритроцитов (число агрегатов к количеству свободных клеток), усредняя значения из трех больших квадратов камеры Горяева [7].

*Оценка влияния магнитных наночастиц на спонтанный гемолиз.* Для получения анализируемого супернатанта инкубационную взвесь центрифугировали 10 мин при 1 600 об./мин. Для оценки количества освобожденного гемоглобина измеряли оптическую плотность полученных супернатантов ( $\lambda = 540$  нм) на спектрофотометре SQ-2802S (UNICO, США).

Коэффициент гемолиза (КГ), %, рассчитывали при помощи уравнения

$$КГ = \frac{(ОПОП - ОПНК)}{(ОППК - ОПНК)} \times 100\%,$$

где ОП – оптическая плотность ( $\lambda = 540$  нм), НК – негативный контроль, ПК – позитивный контроль, ОП – опытный образец.

В качестве позитивного контроля выступали образцы со 100%-м гемолизом, индуцированным добавлением 0,01%-го раствора додецилсульфата натрия при соотношении «образец – реагент» 1 : 10. За негативный контроль принимали образец с добавлением ФР (NaCl 0,9%), КГ менее 5% свидетельствовал об отсутствии гемолитического эффекта наночастиц.

*Определение качественного состава белкового слоя.* Определение белков на поверхности МНЧ осуществляли на ИК-Фурье спектрометре Nicolet 8700 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием приставки НПВО (нарушенное полное внутреннее отражение) (диапазон 4 000–650  $см^{-1}$ , разрешение 2  $см^{-1}$ , 512 сканирований), а также детектора МСТ-А (Thermo Fisher Scientific, США) с рабочей температурой 77 К. В качестве источника возбуждения использовали карбидокремниевый инфракрасный излучатель Global (Kanthal, Швеция). В качестве фона использовался физиологический раствор (NaCl 0,9%), концентрация МНЧ в исследованных образцах составила 2,0 мг/мл. Контролем служили спектры наночастиц в «чистом виде», для получения которых смешивали 1,5 мг МНЧ с 300 мг бромида калия (имеющим спектр поглощения, не совпадающий со спектром химических элементов наночастиц) и готовили пробы в виде таблеток.

*Статистическая обработка данных.* Проверку гипотезы о равенстве средневыборочных величин в нескольких зависимых выборках проводили методами дисперсионного анализа для повторных измерений, значения в группах – методами непараметрической статистики, указывали медиану, 25- и 75-й процентиля ( $Me [Q_{25}; Q_{75}]$ ). Проверку гипотезы о равенстве средневыборочных величин в независимых выборках проводили с использованием критерия Манна – Уитни. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ . Вычисления производили в программе Statistica 10.0.

*Ограничения данной работы.* В настоящем исследовании производилась оценка отдельных параметров гемосовместимости наночастиц, перечень которых был сформирован исходя из возможных токсикологических эффектов данного типа наночастиц.

Т а б л и ц а  
T a b l e

Динамика показателей люминолзависимой хемилуминесценции цельной крови при воздействии магнитных наночастиц (МНЧ), $Me [Q_{25}; Q_{75}]$ Changes in the characteristics of luminal-dependent chemiluminescence of whole blood under the influence of magnetic nanoparticle (MNP), $Me [Q_{25}; Q_{75}]$					
Группа Group	Доза, мг/мл Dose, mg/ml	Время инкубации, ч Incubation period, h			
		0	1	2,5	5
		$I_{max}$ , имп/с $I_{max}$ , cps			
ФР NSS		6,25 [2,86; 6,43]	30,17 [17,54; 31,45] $p_3 < 0,001$	28,60 [27,02; 30,17] $p_3 < 0,001$	20,41 [15,17; 25,65] $p_3 < 0,001$
МНЧ1 MNP1	0,2	13,81 [12,13; 15,50], $p_1 < 0,001; p_2 = 0,044$	32,71 [30,99; 37,21] $p_3 < 0,001;$ $p_2 < 0,001$	26,34 [24,85; 27,82] $p_3 < 0,001$	18,91 [18,49; 19,33] $p_3 < 0,001$
	2,0	11,98 [11,62; 12,33] $p_1 < 0,001$	12,33 [10,44; 13,11] $p_4 < 0,001$	18,44 [18,29; 18,60] $p_4 < 0,001$	12,35 [11,39; 13,32] $p_4 < 0,001$
	20,0	1,66 [1,43; 2,38] $p_1 < 0,001$	9,59 [8,96; 10,21] $p_1 < 0,001$	10,12 [9,89; 10,35] $p_1 < 0,001; p_3 < 0,001$	8,52 [5,32; 11,88] $p_1 < 0,001; p_3 < 0,001; p_2 = 0,037$
МНЧ2 MNP2	0,2	9,22 [5,72; 12,72] $p_1 = 0,037; p_2 = 0,044$	13,50 [12,15; 14,85] $p_1 < 0,001;$ $p_2 < 0,001$	24,20 [23,81; 29,47] $p_3 = 0,046$	9,15 [8,52; 9,77] $p_1 < 0,001$
	2,0	11,07 [6,02; 16,12] $p_1 < 0,001$	12,63 [9,20; 16,06] $p_1 < 0,001$	17,63 [16,06; 20,14] $p_1 < 0,001; p_3 < 0,001$	11,25 [10,98; 11,53] $p_1 < 0,001$
	20,0	3,90 [2,46; 11,65]	10,36 [9,06; 11,65] $p_1 < 0,001$	10,11 [8,00; 15,72] $p_1 < 0,001$	2,01 [1,66; 2,35] $p_1 < 0,001; p_2 = 0,037$
$S$ , имп/с					
ФР NSS		828,53 [695,79; 1557,78]	15371,79 [12888,70; 18840,74] $p_3 < 0,001$	12327,14 [11765,57; 12888,70]	6102,69 [4229,13; 7976,25]
МНЧ1 MNP1	0,2	2803,34 [1980,17; 3626,51] $p_1 < 0,001$	8118,49 [7776,66; 9330,79] $p_1 < 0,001$	9717,43 [8855,82; 10579,05]	5887,48 [5152,13; 6622,83]
	2,0	3875,80 [2715,75; 5035,84]	5035,84 [4849,03; 5794,36] $p_4 < 0,001$	5130,76 [4937,13; 5241,31], $p_4 < 0,001$	4397,94 [4214,31; 4581,57] $p_4 < 0,001$
	20,0	478,93 [456,05; 653,50] $p_2 < 0,001$	3328,39 [3291,60; 3365,18] $p_4 < 0,001$	3953,75 [3703,21; 4204,29] $p_4 < 0,001$	2715,77 [2128,37; 4058,52] $p_2 < 0,001; p_4 = 0,004$
МНЧ2 MNP2	0,2	2013,14 [1385,77; 2640,51]	5382,44 [5125,65; 5639,24]	10036,34 [7302,20; 11932,37]	3178,85 [3061,36; 3296,34]
	2,0	4241,76 [1895,75; 6587,77] $p_1 < 0,001$	4918,03 [3792,51; 6043,54] $p_1 < 0,001$	6208,53 [6043,54; 6862,96] $p_1 < 0,001$	3109,69 [2671,90; 3547,47] $p_1 < 0,001$
	20,0	957,41 [704,18; 1210,64] $p_2 < 0,001; p_4 < 0,001$	3844,87 [3536,11; 4153,63] $p_1 < 0,001$	3626,95 [2253,50; 4298,76] $p_1 < 0,001; p_4 < 0,001$	667,48 [569,60; 765,36] $p_1 < 0,001; p_2 < 0,001;$ $p_4 < 0,001$

П р и м е ч а н и е. ФР – физиологический раствор. Уровень значимости по сравнению с контролем ( $p_1$ ); между МНЧ1 и МНЧ2 одной концентрации ( $p_2$ ); по сравнению с исходными значениями ( $p_3$ ); по сравнению с меньшей концентрацией МНЧ того же типа ( $p_4$ ).

N o t e. NSS – normal saline solution. Significance value as compared to a control group ( $p_1$ ); between MNP1 and MNP2 with the same concentration ( $p_2$ ); as compared to baseline value ( $p_3$ ); as compared to lower concentration of MNP of the same type ( $p_4$ ).



## РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование генерации активных форм кислорода в условиях влияния магнитных наночастиц. Показатели максимальной интенсивности свечения  $I_{\max}$  и полной светосуммы  $S$  в образцах всех исследуемых групп представлены в таблице.

В образцах крови с добавлением ФР через 1 ч инкубации отмечалось достоверное повышение показателей ХЛ относительно исходного уровня, сохранявшееся в течение всего эксперимента. Это, вероятно, являлось свидетельством интенсификации выработки АФК в экспериментальных условиях [8]. Показатели ХЛ при воздействии наночастиц обоих видов в минимальной концентрации до инкубации (непосредственно после добавления МНЧ) были на более высоком уровне в сравнении с группой ФР, однако в течение инкубации отмечалось снижение ХЛ. Так, показатели ХЛ при воздействии наночастиц обоих видов в минимальной концентрации через 1 и 2,5 ч были ниже по сравнению с группой ФР на том же этапе исследования.

Через 5 ч показатели ХЛ группы МНЧ1 снижались до уровня контрольных, в то время как в группе МНЧ2 достигали достоверно более низких значений. С увеличением концентрации наночастиц вышеописанная динамика ХЛ в ходе проведения эксперимента сохранялась. На момент окончания эксперимента (5 ч) показатели интенсивности и светосуммы обеих групп значимо не отличались друг от друга и находились на досто-

верно более низком уровне относительно контроля. На фоне увеличения концентрации МНЧ до 20,0 мг/мл и времени их воздействия отмечалось снижение генерации АФК под влиянием наночастиц, при этом МНЧ2 оказывают достоверно больший эффект в сравнении с МНЧ1.

Таким образом, исследуемые магнитные наночастицы снижают спонтанную хемилюминесценцию цельной крови. Увеличение концентрации наночастиц обоих типов (от 0,2 до 20,0 мг/мл) и увеличение времени их воздействия (0; 1; 2,5 и 5 ч) обеспечивают усиление данного влияния. МНЧ2 оказывают более выраженный эффект в отношении снижения генерации активных форм кислорода.

Исследование влияния МНЧ на спонтанную агрегацию эритроцитов крови человека. Степень спонтанной агрегации эритроцитов под влиянием магнитных наночастиц представлена на рис. 1. Общее количество эритроцитов статистически не различалось в контрольных и испытуемых образцах ( $p > 0,05$  между группами) и составляло в среднем  $4,8 \times 10^{12}/л$ , что свидетельствовало об отсутствии возможного осаждения из взвеси эритроцитов, ассоциированных с наночастицами и, следовательно, отсутствии вероятности изменения агрегации эритроцитов за счет изменения их концентрации в среде (а не под влиянием наночастиц). Во всех исследуемых группах через 5 ч инкубации наблюдался гемолиз, что не позволило произвести адекватную оценку степени агрегации эритроцитов.

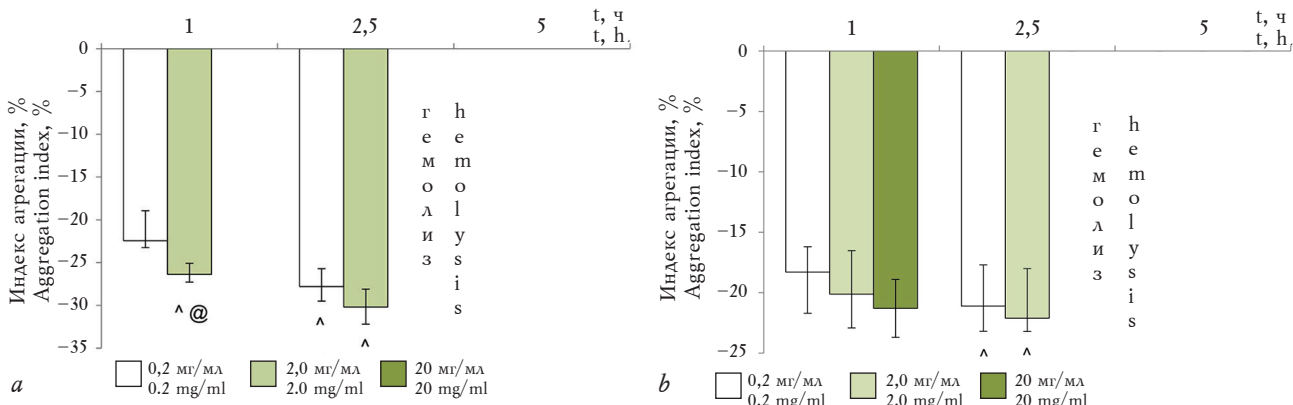


Рис. 1. Изменение агрегации эритроцитов под влиянием МНЧ1 (а) и МНЧ2 (б) по сравнению с исходными значениями непосредственно после добавления МНЧ или ФР: ^ –  $p = 0,045$  между МНЧ1 и МНЧ2 одной концентрации; @ –  $p = 0,037$  по сравнению с меньшей концентрацией МНЧ того же типа

Fig. 1. The change in erythrocyte aggregation under the influence of MNP1 (a) and MNP2 (b) in comparison with baseline values immediately after the addition of MNP or NSS: ^ –  $p = 0.045$  between MNP1 and MNP2 of the same concentration; @ –  $p = 0.037$  in comparison with the lower concentration of the MNO of the same type

В группах МНЧ1 и МНЧ2 (доза 0,2 мг/мл) наблюдалось достоверное снижение степени агрегации в среднем на 20%. Данный показатель не претерпевал значительных изменений с течением

времени (1,0–2,5 ч). Увеличение концентрации МНЧ1 до 2,0 мг/мл (в 10 раз) обеспечивало достоверное увеличение оказываемого эффекта до 27% через 1 ч инкубации, чего не наблюдалось

в группе МНЧ2. Увеличение времени инкубации не повлияло на степень агрегации эритроцитов. В группе МНЧ1 в дозе 20,0 мг/мл происходил гемолиз через 1 ч инкубации, что привело к невозможности оценки степени агрегации. При этом в образцах группы МНЧ2 в дозе 20,0 мг/мл на данном этапе эксперимента отмечалось снижение показателя агрегации эритроцитов на 21% по сравнению с контролем, однако через 2,5 ч – выраженный гемолиз.

Таким образом, при 2,5-часовой инкубации крови с МНЧ1 в диапазоне концентраций 0,2–2,0

мг/мл имеет место дозозависимое нарастание эффекта в виде снижения агрегации эритроцитов, не изменяющегося в течение инкубации. МНЧ2 в концентрациях 0,2 и 2,0 мг/мл в равной степени обеспечивают данный эффект, также не изменяющийся со временем инкубации. В условиях воздействия МНЧ1 степень агрегации эритроцитов достоверно ниже по сравнению с МНЧ2.

*Исследование влияния МНЧ на спонтанный гемолиз.* Значения коэффициента гемолиза образцов крови исследуемых групп представлены на рис. 2.

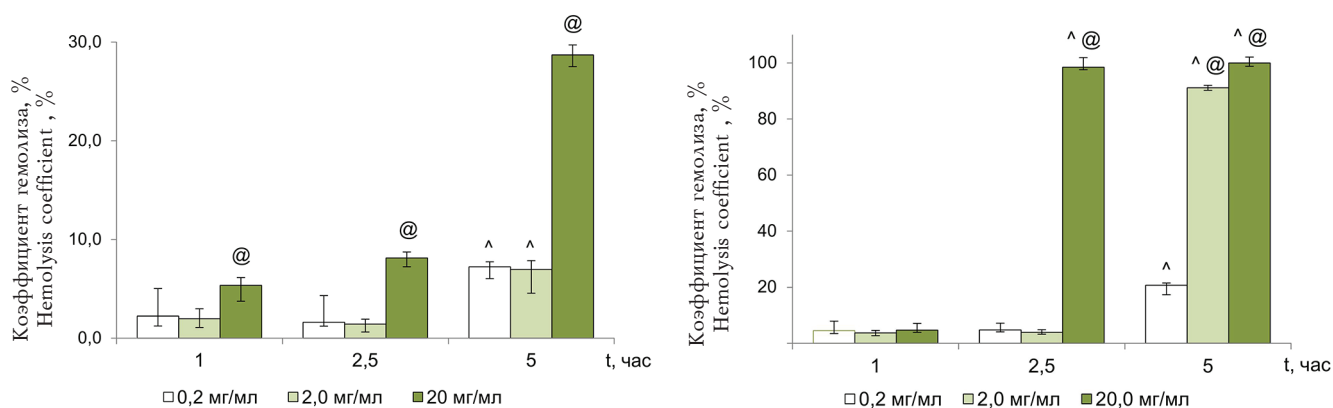


Рис. 2. Влияние магнитных наночастиц МНЧ1 (а) и МНЧ2 (б) на спонтанный гемолиз: ^ –  $p = 0,014$  между МНЧ1 и МНЧ2 одной концентрации; @ –  $p = 0,029$  по сравнению с меньшей концентрацией МНЧ того же типа

Fig. 2. Influence of magnetic nanoparticles MNP1 (a) and MNP2 (b) on spontaneous hemolysis: ^ –  $p = 0.014$  between MNP1 and MNP2 of the same concentration; @ –  $p = 0.029$  in comparison with the lower concentration of MNP of the same type

При воздействии наночастиц обоих типов в минимальной концентрации гемолиз наблюдался только после 5 ч инкубации: 7% для МНЧ1 и 20% для МНЧ2 ( $p < 0,05$  между группами). При увеличении концентрации до 2 мг/мл гемолиз также наблюдался только через 5 ч: 6,9 и 91,1% для МНЧ1 и МНЧ2 соответственно. В группе МНЧ1 в дозе 20,0 мг/мл через 2,5 ч наблюдался незначительный гемолитический эффект (8%), который на момент окончания эксперимента увеличивался до 28,7%, в то время как в группе МНЧ2 в дозе 20,0 мг/мл уже через 2,5 ч инкубации наблюдался 98%-й гемолиз.

Таким образом, гемолитическая активность исследуемых наночастиц носила дозозависимый характер и увеличивалась с течением времени. Наночастицы магнетита и композитные частицы магнетита-кремнезема в диапазоне концентраций 0,2–2,0 мг/мл не проявляли гемолитической активности до 2,5-часовой инкубации. В дозе 20,0 мг/мл наночастицы оказывали выраженное гемолитическое действие, при этом наиболее выраженное разрушение эритроцитов обеспечива-

ли композитные наночастицы магнетита-кремнезема.

*Исследование кинетики формирования белкового слоя на поверхности наночастиц.* ИК-спектры исследуемых образцов (2,0 мг/мл) представлены на рис. 3.

Полученные данные характеризовались типичным для образцов крови набором пиков [9] с выраженными изменениями в спектральном диапазоне 3 000–3 300  $\text{cm}^{-1}$ , определяющих наличие альбумина на поверхности магнитных наночастиц. С увеличением времени инкубации отмечалось изменение соотношения интенсивности указанных колебаний для обоих типов наночастиц во всем диапазоне доз. Вероятно, такие изменения ИК-Фурье спектров связаны с конформационными изменениями белка при формировании «белковой короны» вследствие длительной инкубации [10].

Таким образом, в условиях взаимодействия наночастиц с плазмой крови на поверхности исследованных видов МНЧ происходит формирование белкового слоя, качественный состав которого не

зависит от поверхностных характеристик МНЧ (по местоположению пиков) и представлен доминирующим по количеству в плазме крови альбумином. В условиях 5-часовой инкубации отмечаются

конформационные изменения белка (подтверждается соотношением пиков к изолинии), ассоциированного с поверхностью наночастиц обоих типов во всем диапазоне доз (0,2–20,0 мг/мл).

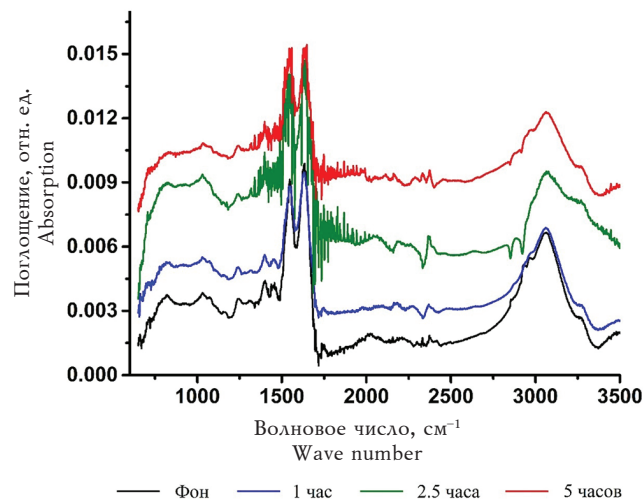
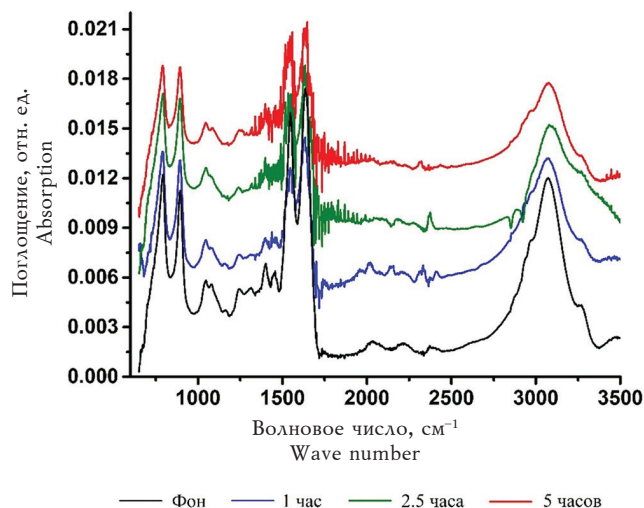


Рис. 3. ИК-Фурье спектры образцов крови, инкубированных с наночастицами в дозе 2,0 мг/мл: *a* – МНЧ1, *b* – МНЧ2  
Fig. 3. IR Fourier-spectrum of blood samples incubated with nanoparticles at a dose of 2.0 mg / ml: *a* – MNP1, *b* – MNP2

## ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании проводилось изучение гемосовместимости наночастиц магнетита и композитных частиц магнетита-кремнезема, различающихся по физико-химическим характеристикам и наличию или отсутствию оболочки. Целью тестирования гемосовместимости являлось изучение возможных нежелательных изменений в крови, обусловленных воздействием наночастиц.

На основании результатов, полученных в ходе изучения влияния наночастиц на выработку свободных радикалов, установлено, что магнитные наночастицы обеспечивают снижение спонтанной ХЛ цельной крови в процессе инкубации, что может быть обусловлено снижением генерации активных форм кислорода [11, 12]. При этом данный эффект усиливался при увеличении концентрации наночастиц и времени их воздействия. Можно предположить, что одной из причин указанной динамики хемилюминесценции крови в условиях воздействия наночастиц являлось формирование белковой оболочки на поверхности наночастиц, что обеспечивало постепенное снижение их реакционной способности.

Другой возможной причиной может быть компенсаторная активация антиоксидантных систем плазмы крови в ответ на первоначальное воздействие наночастиц при их добавлении в инкубационную среду. Также нельзя исключить и

вероятность связывания самими наночастицами свободных радикалов и (или) их стимулирующее влияние на ферменты антиоксидантных систем. Следует отметить, что наиболее выраженное снижение ХЛ наблюдалось на фоне воздействия композитных наночастиц магнетита-кремнезема. Результаты исследования гемолитической активности наночастиц показали, что наночастицы магнетита и композитные частицы магнетита-кремнезема в диапазоне концентраций 0,2–2,0 мг/мл не проявляли гемолитической активности до 2,5-часовой инкубации. Однако с увеличением времени инкубации отмечалось усиление гемолитического эффекта наночастиц, при этом наночастицы магнетита-кремнезема обеспечивали более выраженный гемолиз. Усиление гемолиза происходило, предположительно, благодаря ослаблению механической прочности плазматической мембраны эритроцитов и уменьшению ее эластичности в условиях длительного 5-часового воздействия наночастиц.

Показано снижение степени агрегации эритроцитов в условиях воздействия наночастиц. При этом наночастицы магнетита оказывали более выраженный эффект по сравнению с композитными наночастицами магнетита-кремнезема при 2,5-часовой инкубации с кровью. В данном случае описанный эффект, возможно, обусловлен тем, что МНЧ адсорбируют на своей поверхности белки, образуя «белковую корону» (о чем

свидетельствуют результаты, полученные в ходе изучения кинетики формирования белкового слоя на поверхности наночастиц). Со временем количество адсорбированного белка на МНЧ увеличивается (заметно по росту значений максимумов поглощения спектров ИК-Фурье во времени, см. рис. 3), что, вероятно, и обеспечивало снижение агрегации эритроцитов.

Предположительно, взаимодействие белков с поверхностью наночастиц магнетита является более выраженным по сравнению с композитными наночастицами. Не исключено, что такое взаимодействие наночастиц с белками плазмы могло обеспечивать изменение заряда форменных элементов крови, что, в свою очередь, также влияло на степень агрегации эритроцитов. Продемонстрированное в ходе наших исследований отсутствие гемолитического эффекта наночастиц в концентрациях 0,2–2 мг/мл не позволяет рассматривать гипоагрегационный эффект наночастиц как токсический или лизирующий эффект на эритроциты (т. е. реализуемый за счет уменьшения их количества в среде).

В целом полученные результаты свидетельствуют о гемосовместимости магнитных наночастиц магнетита и композитных наночастиц магнетита-кремнезема в концентрациях 0,2–2,0 мг/мл, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных кандидатов для разработки лекарственных средств на основе наночастиц для внутривенного применения. Повышение концентрации наночастиц указанных типов до 20,0 мг/мл обуславливает проявление ими токсического эффекта в отношении цельной крови человека, о чем свидетельствуют результаты изучения гемолитической активности частиц. Общепринятым считается, что такие факторы, как форма наночастиц, а также их размер, являются критическими параметрами, определяющими в значительной мере биосовместимость наночастиц. Установлено, что наночастицы сферической формы оказывают менее выраженные токсические эффекты в организме, чем подобные им частицы стержнеобразной формы [13]. Предполагается также, что уменьшение размера частиц приводит к экспоненциальному увеличению площади их поверхности по отношению к объему, что обуславливает высокую химическую активность наночастиц и их высокую реакционную способность. Иными словами, чем меньше размер частиц, тем больше их удельная площадь и степень токсичности [13, 14].

Кроме того, в зависимости от размера наночастиц могут изменяться их магнитные, адсорбционные свойства и многие другие, обуславливая

в свою очередь различный характер взаимодействия наночастиц с биологическими структурами. Несмотря на игольчатую форму наночастиц магнетита, их меньший размер, а также более низкую агрегативную устойчивость (по сравнению с композитными частицами), наночастицы данного типа оказывают наименее выраженное токсическое воздействие на клетки крови. Полученные данные согласуются с более ранними результатами авторов [6]. Вероятно, данный факт обусловлен более интенсивным связыванием альбумина на поверхности наночастиц магнетита и их агрегированием вследствие отсутствия защитной оболочки (в отличие от композитных наночастиц). Таким образом, после быстрого формирования «белковой короны» на поверхности наночастиц магнетита последние становятся биологически инертными в отличие от наночастиц магнетита-кремнезема, оболочка которых препятствует агрегации наночастиц и может содержать остатки кремнийорганических соединений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в ходе исследования данные позволили сделать вывод о влиянии магнитных наночастиц на спонтанную хемилюминесценцию крови, агрегативную устойчивость эритроцитов, спонтанный гемолиз в зависимости от материала поверхности наночастиц, их концентрации, а также времени инкубации. Магнитные наночастицы магнетита и композитные частицы магнетита-кремнезема в диапазоне доз 0,2–2,0 мг/мл биосовместимы в отношении клеток крови человека в условиях их воздействия в течение 2,5 ч. Повышение концентрации наночастиц указанных типов до 20,0 мг/мл обуславливает проявление ими токсического эффекта в отношении цельной крови человека. Наиболее выраженное токсическое воздействие на клетки крови оказывают наночастицы магнетита-кремнезема.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов в связи с публикацией данных материалов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Торопова Я.Г. – руководитель проекта, разработка дизайна эксперимента, создание рукописи. Королев Д.В., Гареев К.Г. – синтез МНЧ, подготовка коллоидных растворов. Печникова Н.А., Маркитантова А.С., Богушевская В.Д. – проведение экспериментов, обработка результатов. Зелинская И.А. – проведение экспериментов, подготовка рукописи. Поволоцкая А.В., Маньшина А.А. – выполнение ИК-Фурье спектроскопии.



## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование частично поддержано грантом Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 16-32-60010.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с применением оборудования Ресурсных центров Санкт-Петербургского государственного университета «Инновационные технологии композитных наноматериалов» и «Оптические и лазерные методы исследования вещества».

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Liu X.L., Choo E.S.G., Ahmed A.S., Zhao L.Y., Yang Y., Ramanujan R.V., Xue J.M., Fan D.D., Fan H.M., Ding J. Magnetic nanoparticle-loaded polymer nanospheres as magnetic hyperthermia agents. *J. Mater. Chem. B*. 2014; 1 (2): 120–128. DOI: 10.1039/C3TB21146K.
- Chu M., Shao Y., Peng J., Dai X., Li H., Wu Q., Shi D. Near-infrared laser light mediated cancer therapy by photothermal effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles. *Biomaterials*. 2013; 34 (16): 4078–4088. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.086.
- Hainfeld J.F., Slatkin D.N., Focella T.M., Smilowitz H.M. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *Br. J. Radiol.* 2006; 79 (939): 248–253. DOI: 10.1259/bjr/13169882.
- Kharitonovskii P.V., Gareev K.G., Ionin S.A., Ryzhov V.A., Bogachev Y.V., Klimenkov B.D., Kononova I.E., Moshnikov V.A. Microstructure and Magnetic State of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub> Colloidal Particles. *J. Magn.* 2015; 20 (3): 221–228. DOI: 10.4283/jmag.2015.20.3.221.
- Gareev K.G., Ionin S.A., Korolev D.V., Luchinin V.V., Moshnikov V.A., Panov M.F., Permyakov N.V. Study of colloidal particles FemOn-SiO<sub>2</sub> synthesized by two different techniques. *J. Phys. Con. Ser.* 2015; 643 (1): 012088. DOI: 10.1088/1742-6596/643/1/012088.
- Toropova Y.G., Golovkin A.S., Malashicheva A.B., Korolev D.V., Gorshkov A.N., Gareev K.G., Afonin M.V., Galagudza M.M. In vitro toxicity of FemOn, FemOn-SiO<sub>2</sub> composite, and SiO<sub>2</sub>-FemOn core-shell magnetic nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine*. 2017; 12: 593–603. DOI: 10.2147/ijn.s122580.
- Гущин А.Г., Полулях С.В., Мурашова Н.А., Калаева С.З., Ершова А.Н. Влияние наночастиц магнетита на гемореологические показатели. *Ярославский педагогический вестник*. 2011; 3 (1): 89–93. [Gushhin A.G., Poluljah S.V., Murashova N.A., Kalaeva S.Z., Ershova A.N. Effect of magnetite nanoparticles on haemorheological indices. *Jaroslavskij pedagogicheskij vestnik – Yaroslavl Pedagogical Herald*. 2011; 3 (1): 89–93 (in Russ.)].
- Rinaldi M., Cecilian F., Lecchi C., Moroni P., Bannerman, D.D. Differential effects of α1-acid glycoprotein on bovine neutrophil respiratory burst activity and IL-8 production. *Vet. Immunol Immunopathol.* 2008; 126 (3-4): 199–210. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.07.001.
- Kong J.Yu.S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2007; 39 (8): 549–559. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.
- Vertegel A.A., Siegel R.W., Dordick J.S. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir*. 2004; 20 (16): 6800–6807. DOI: 10.1021/la0497200.
- Короткова А.М., Лебедев С.В., Каюмов Ф.Г., Сизова Е.А. Морфофизиологические изменения у пшеницы (*Triticum vulgare* L.) под влиянием наночастиц металлов (Fe, Cu, Ni) и их оксидов (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, CuO, NiO). *Сельскохозяйственная биология*. 2017; 52 (1): 172–182. [Korotkova A.M., Lebedev S.V., Kajumov F.G., Sizova E.A. Morphophysiological changes in wheat (*Triticum vulgare* L.) under the influence of metal nanoparticles (Fe, Ni, Ni) and their oxides (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, CuO, NiO). *Sel'skhozjajstvennaja biologija – Agricultural Biology*. 2017; 52 (1): 172–182. (in Russ.)]. DOI:10.15389/agrobiology.2017.1.172rus.
- Szekeres M., Illés E., Janko C., Farkas K., Tyth I.Y., Nesztor D., Zupky I., Földesi I., Alexiou C., Tombác E. Hemocompatibility and biomedical potential of poly(gallic acid) coated iron oxide nanoparticles for theranostic use. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2015; 6 (1): 252. DOI: 10.4172/2157-7439.1000252.
- Gatoo M.A., Naseem S., Arfat M.Y., Mahmood Dar.A., Qasim K., Zubair S. Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed Research International*. 2014; 2014: 498420. DOI: 10.1155/2014/498420/
- Guichard Y., Schmit J., Darne C., Gaté L., Goutet M., Rousset D., Fierro V. Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells. *Annals of Occupational Hygiene*. 2012; 56 (5): 631–644. DOI: 10.1093/annhyg/mes006.

Поступила в редакцию 10.10.2017

Подписана в печать 15.05.2018

**Торопова Яна Геннадьевна**, канд. биол. наук, зав. НИЛ биопротезирования и кардиопротекции, НМИЦ им. В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

**Печникова Надежда Александровна**, специалист, группа доклинических исследований, НМИЦ им. В.А. Алмазова; Санкт-Петербургская государственная химико-фармакологическая академия, г. Санкт-Петербург.

**Зелинская Ирина Александровна**, мл. науч. сотрудник, НМИЦ им. В.А. Алмазова; Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, г. Санкт-Петербург.

Королёв Дмитрий Владимирович, канд. техн. наук, доцент, зав. НИЛ нанотехнологий, НМИЦ им. В.А. Алмазова; Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, г. Санкт-Петербург.

Гареев Камилъ Газинурович, канд. техн. наук, ассистент, СПбГЭУ «ЛЭТИ» им. В.И. Ульянова (Ленина), г. Санкт-Петербург.

Маркитантова Анастасия Сергеевна, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург.

Богушевская Влада Дмитриевна, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург.

Поволоцкая Анастасия Валерьевна, канд. физ.-мат. наук, зам. директора ресурсного центра «Оптические и лазерные методы исследования вещества», СПбГУ, г. Санкт-Петербург.

Маньшина Алина Анвяровна, д-р хим. наук, доцент, СПбГУ, г. Санкт-Петербург.

(✉) Торопова Яна Геннадьевна, e-mail: yana.toropova@mail.ru.

УДК 57.085.25:549.731.13-022.532

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2018-3-157-167>

For citation: Toropova Y.G., Pechnikova N.A., Zelinskaya I.A., Korolev D.V., Gareev K.G., Markitantova A.S., Bogushevskaya V.D., Povolotskaya A.V., Manshina A.A. Hemocompatibility of magnetic magnetite nanoparticles and magnetite-silica composites *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2018; 17 (3): 157–167.

## Hemocompatibility of magnetic magnetite nanoparticles and magnetite-silica composites *in vitro*

Toropova Y.G.<sup>1</sup>, Pechnikova N.A.<sup>1, 2</sup>, Zelinskaya I.A.<sup>1, 3</sup>, Korolev D.V.<sup>1, 3</sup>, Gareev K.G.<sup>4</sup>, Markitantova A.S.<sup>5</sup>, Bogushevskaya V.D.<sup>5</sup>, Povolotskaya A.V.<sup>6</sup>, Manshina A.A.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> V.A. Almazov National North-West Medical Research Centre  
15b, Parkbomenko Av., Saint-Petersburg, 194156, Russian Federation

<sup>2</sup> Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy  
14a, Professor Popov Str., Saint-Petersburg, 197022, Russian Federation

<sup>3</sup> Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics  
49, Kromverskiy Av., Saint-Petersburg, 197101, Russian Federation

<sup>4</sup> Saint Petersburg Electrotechnical University “LETI”  
5, Professor Popov Str., Saint-Petersburg, 197376, Russian Federation

<sup>5</sup> Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University  
29, Politekhnicheskaya Str., Saint-Petersburg, 195251, Russian Federation

<sup>6</sup> Saint Petersburg State University  
5, Ulyanovskaya Str., Saint-Petersburg, Peterhof, 198504, Russian Federation

### ABSTRACT

The goal of the present research is to study the hemocompatibility of magnetic nanoparticles (MNPs) in model systems *in vitro*.

**Materials and methods.** Magnetite nanoparticles and magnetite colloidal solutions were used in 0.9% NaCl in concentrations 0.2, 2.0 and 20.0 mg/ml. The study was performed with heparinized human whole blood, 1 ml of which was mixed with 1 of ml nanoparticles/physiological solution. Measurements were made directly after mixing, and then 1, 2.5 and 5 hours later. The amount of reactive oxygen species (ROS) was measured with luminol-dependent chemiluminescence (CL). An erythrocyte aggregation index was calculated. For the assessment of hemolytic properties, a hemolysis coefficient was calculated based on optical density of the plasma. The nanoparticless surface protein layer investigation was performed with IR-Fourier spectroscopy.

**Results.** Nanoparticles decline CL in time- and concentration-dependent manner. Erythrocyte aggregation stability grows, but concentration and/or application time increment leads to significant hemolysis. IR-Fourier spectroscopy data shows albumin as main component of protein crown, whose conformation changes in time.

Given data proves safety of studied MNPs in relation to examined parameters in low (0.2 and 2.0 mg/ml) concentrations up to 2.5 hours interaction. This allows us to treat these MNPs as a promising agents for further use in medical practice after completing examinations related to other homeostasis indicators.

**Key words:** magnetic nanoparticles, hemocompatibility, chemiluminescence, erythrocyte aggregation, hemolysis, «albuminous crown», IR-Fourier spectroscopy.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

#### SOURCE OF FINANCING

The research is partially financed by Russian Foundation for Basic Research, project № 16-32-60010.

Received 10.10.2017

Accepted 15.05.2018

**Toropova Yana G.**, PhD, Associate Professor, Head of Bioprosthesis and cardioprotection Research Lab, V.A. Almazov National North-West Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russian Federation.

**Pechnikova Nadezhda A.**, Expert of Preclinical Research Group, V.A. Almazov National North-West Medical Research Centre; Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, Saint Petersburg, Russian Federation.

**Zelinskaya Irina A.**, Junior Researcher, V.A. Almazov National North-West Medical Research Centre; Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, Saint Petersburg, Russian Federation.

**Korolev Dmitriy V.**, PhD, Associate Professor, Head of Nanotechnology Research Lab, V.A. Almazov National North-West Medical Research Centre; Saint Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, Saint Petersburg, Russian Federation.

**Gareev Kamil G.**, PhD, Assistant Professor, Saint Petersburg Electrotechnical University "LETI", Saint Petersburg, Russian Federation.

**Markitantova Anastasia S.**, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russian Federation.

**Bogushevskaya Vlada D.**, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russian Federation.

**Povolotskaya Anastasia V.**, PhD, Vice Director, Center for Optical and Laser Materials Research; Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russian Federation.

**Manshina Alina A.**, DChSc, Associate Professor, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russian Federation.

(✉) **Toropova Yana G.**, e-mail: yana.toropova@mail.ru.