

М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, Е.А. Сладкова, Р.В. Деркачев, Н.А. Забиняков

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ КРОВИ

Проведены исследования дыхательной функции крови при однократном интрагастральном введении железооксидных наночастиц. Установлено возрастание кислородной емкости крови, сопровождаемое снижением числа эритроцитов, уменьшением их размеров и усилением гиперхромности. Выявлено неравномерное распределение наночастиц по периферии клетки, где заметно возрастал модуль упругости.

Ключевые слова: эритроциты, гемоглобин, геометрические параметры, модуль упругости, атомно-силовая спектроскопия, кислородная емкость крови.

M.Ju. Skorkina, M.Z. Fedorova, E.A. Sladkova, R.V. Derkachev, N.A. Zabinyakov

THE EFFECT OF THE IRON NANOPARTICLES ON THE BLOOD OXYGEN CAPACITY

The study of the blood oxygen transport was completed under conditions of one step intragastral delivery ferrous oxide nanoparticles. It was found that an increase of the blood oxygen capacity is accompanied by a decrease of erythrocyte number together with their size reduction and a cell hyperchromaty. It has been found non-uniform nanoparticle distribution on the red cell surface periphery and there was the cell membrane elasticity module was increased there.

Keywords: erythrocytes, hemoglobin, geometrical parameters, the elasticity module, atom-power spectroscopy, blood oxygen capacity.

Введение

Одним из перспективных направлений адресной доставки физиологически активных веществ является использование эритроцитов в качестве транспортеров для переноса наночастиц с целью защиты их от иммунных реакций. Вместе с тем, существует потенциальный риск негативного воздействия нанообъектов на функции организма [13]. Установлено, что токсический эффект, вызываемый металлическими и оксидными наночастицами, зависит от их размеров: большую токсичность проявляют частицы меньшего размера [1]. В экспериментальных исследованиях показано разрушение молекул ДНК наночастицами TiO₂ [18]. В работе [14] представлены экспериментальные данные о цитотоксических свойствах широкого круга металлооксидных наночастиц, при этом установлено, что повышение их концентрации снижает жизнеспособность клеток. Токсический эффект искусственных нанообъектов на биологические системы определяется особыми физико-химическими свойствами, структурными особенностями и размерами наночастиц [15]. Цель исследования – изучить воздействие наночастиц железа на морфофункциональные характеристики эритроцитов и дыхательную функцию крови.

Материалы и методы исследования

В работе использован препарат с условным названием маггемит γ -Fe₂O₃, содержащий примеси гематита и магнетита. Нанодисперсный γ -Fe₂O₃ представляет собой нанотрубки длиной 100 нм, диаметром 10 нм. Ширина канала внутри нанотрубок 2-3 нм.

Оценку эффективности воздействия вводимого железосодержащего препарата на дыхательную функцию крови проводили на 20 половозрелых самцах беспородных лабораторных крыс. Животных разделили на две группы – опытную и контрольную, сформированные по принципу аналогов. В опытной группе животных производили однократное интрагастральное введение препарата. Объем вводимой суспензии составлял 1 мл, при концентрации наночастиц оксида железа II 100 мг\мл. Перед введением суспензия проходила сонификацию в ультразвуковой ванне Сапфир УЗВ-1,3 ТТЦ (Россия) в течение 10 минут с целью предотвращения агрегации наночастиц. По истечении 24

часов после введения препарата брали кровь на анализ. Контрольной группе животных вводили такое же количество воды.

Кровь получали путем декапитации у предварительно наркотизированных животных. В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 20 ед./мл. Кровь крысы центрифугировали 10 минут при 1500 об./мин. Эритроциты отмывали и ресуспендировали в изотоничном буферном растворе. У животных опытной и контрольной групп подсчитывали число эритроцитов в камере Горяева, определяли концентрацию гемоглобина – фотоколориметрически, измеряли показатель гематокрита после центрифугирования цельной крови на гематокритной центрифуге. Эритроцитометрию осуществляли на сканирующем зондовом микроскопе Интегра Вита NT-MDT в режиме полуконтактного сканирования. В работе применяли кремниевые зонды серии NSG03 (NT-MDT), жесткостью 1,1 Н/м с радиусом закругления 10 нм, частотой развертки сканирования порядка 0,6-0,8 Нз. На полученных сканах измеряли диаметр, высоту и объем клеток. Обработку полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения “Nova 1.0.26 Build 1397” (НТ МДТ). Эритроцитометрия выполнена на 180 клетках из каждой группы животных. Дыхательную функцию крови оценивали по результатам эритроцитометрии и гематологическим параметрам [6]: рассчитывали общую площадь поверхности эритроцитов по формуле Хуртадо:

$$S = \frac{2V}{T} + 2\pi TR, \quad (1)$$

где V – объём, мкм³; T – толщина, мкм; R – средний радиус эритроцита, мкм.

Содержание гемоглобина в одном эритроците – по формуле (2):

$$MCH = \frac{Hb}{RBC}, \quad (2)$$

где Hb – концентрация гемоглобина, г/л, RBC – число эритроцитов 10¹² л⁻¹.

Среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците – по формуле (3):

$$MCHC = \frac{Hb}{Ht}, \quad (3)$$

где Hb – концентрация гемоглобина, г/л, Ht – показатель гематокрита, л/л.

Кислородную емкость крови вычисляли исходя из концентрации гемоглобина, учитывая, что 1 г гемоглобина при полном насыщении связывает 1,34 мл кислорода.

Эффективность воздействия наночастиц железа на упругие свойства эритроцитов изучали в режиме атомно-силовой спектроскопии при наложении нагрузки в 25 локальных участках клеточной поверхности (рис. 1).

В основе метода лежит снятие «силовых кривых» (DFL (Z)) с поверхности, отражающих отклонение гибкой консоли АСМ-зонда при приближении зонда к образцу в каждой точке наноиdentирования [7]. Отклонение балки от положения равновесия детектируется на четырехсекционном фотодиоде и выражается через ток рассогласования между верхней и нижними частями фотодиода. Расчет локального модуля Юнга проводили согласно [16, 19] на основе модели Герца контактной задачи в модификации Снедона [12, 17]. При работе с клетками допускалось, что клетка есть упругая изотропная среда с коэффициентом Пуассона $\nu=0,5$, а игла АСМ – твердый конус. Полученные «силовые кривые» обрабатывали с помощью программного обеспечения «Ef3» (NT-MDT, Зеленоград). Анализ зависимости деформации образца от приложенной нагрузки позволил количественно оценить модуль упругости и сравнить этот показатель на разных участках клеточной поверхности. АСМ-измерения модуля Юнга проведены на 30 клетках в каждой экспериментальной группе животных. Полученные экспериментальные данные статистически обработаны. Достоверность различий определяли с использованием t критерия Стьюдента. Все опыты выполнены с учетом требований Хельсинской (1977) декларации о гуманном обращении с лабораторными животными.

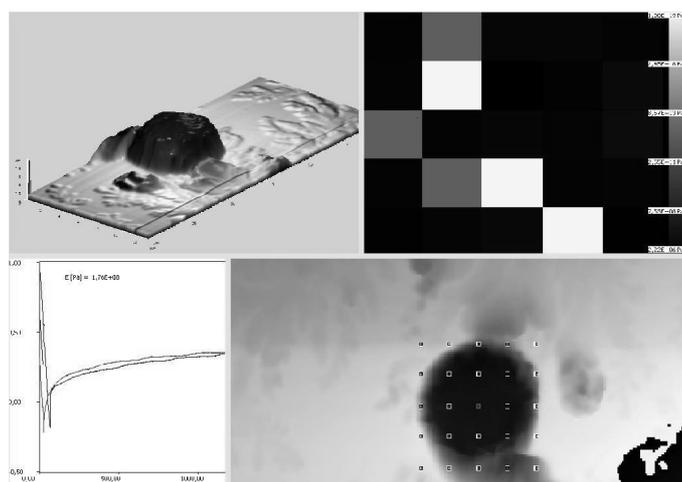


Рис. 1. Точки наноидентирования на поверхности эритроцита

Результаты исследования и их обсуждение

Однократное пероральное введение наночастиц железа вызывало снижение числа эритроцитов на 9,44% ($p < 0,05$) и резкое увеличение концентрации гемоглобина на 58,36% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1

Морфологические и функциональные параметры эритроцитов крыс при введении наночастиц железа

Параметры	Контроль	Опыт
Число эритроцитов, 10 ¹² л ⁻¹	7,52±0,24	6,81±0,005*
Концентрация гемоглобина, г/л	145,32±3,73	230,13±8,05*
Гематокрит, %	0,36±0,008	0,37±0,008
МСН, пг	20,12±5,62	33,54±0,95*
МСНС, г/л	394,14±10,10	610,61±28,34*
Кислородная емкость крови, об%	194,73±5,06	308,57±10,74*
Диаметр клетки, мкм	5,79±0,07	5,67±0,04
Высота клетки, мкм	0,47±0,01	0,42±0,01*
Объем клетки, мкм ³	30,55±1,41	23,46±1,09*
Площадь поверхности, мкм ²	152,20±8,73	117,25±6,57*

Примечания: * Статистическая значимость достоверности различий опытной группы по сравнению с данными контрольной группы при $p \leq 0,05$. МСН – среднее содержание гемоглобина в эритроците, МСНС – средняя концентрация гемоглобина в эритроците.

В опытной группе животных уменьшались высота, объем, площадь поверхности соответственно на 11,9, 23,3 и 22,9% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Под воздействием наночастиц железа реакция эритроидного звена системы крови, направленная на снижение размеров клеток, протекала на фоне изменений функциональных характеристик эритроцитов. Это выражалось в увеличении концентрации гемоглобина в эритроците до 33,54±0,9 пг в опытной группе животных, что повлекло возрастание кислородной емкости крови на 58,4% ($p < 0,05$). При этом диаметр эритроцитов и показатель гематокрита практически не отличались у животных опытной и контрольной групп.

Усиление дыхательной функции крови при однократном введении наночастиц железа на фоне изменения геометрического профиля клеток связано с включением перераспределительных реакций в системе, направленной на поддержание кислородного гомеостаза. В частности, геометрический профиль и содержание гемоглобина в каждом эритроците играет ключевую роль в процессах оксигенации: чем мельче эритроцит, тем выше скорость поглощения кислорода гемоглобином в легких [9]. В данном случае уменьшение размеров эритроцитов в опытной группе, сопровождаемое увеличением концентрации в них гемоглобина, способствует лучшей оксигенации тканей. Гиперхромия эритроцитов крыс опытной группы поддерживает кислородно-транспортную функцию крови при пониженном количестве эритроцитов, что улучшает ее реологические свойства [2]. Полагаем, что сложившееся ранее представление о связи между объемом клетки и содер-

жанием в ней гемоглобина [4] может оспариваться. Более того, в эритроците генетически зафиксировано определенное число молекул гемоглобина, которое может быть синтезировано независимо от размеров клетки [10]. В клетках красного ряда установлена конформационная изменчивость гемоглобинов, отражающаяся на их функциональных способностях [11].

В связи с появлением гиперхромных эритроцитов, имеющих измененный геометрический профиль, нами была предпринята попытка построить карты локальной упругости клеточной поверхности по точкам нанoidентирования. На полученных сканах в опытной группе животных наблюдалась агрегация наночастиц и неравномерное их распределение по мембране эритроцитов (рис. 2).

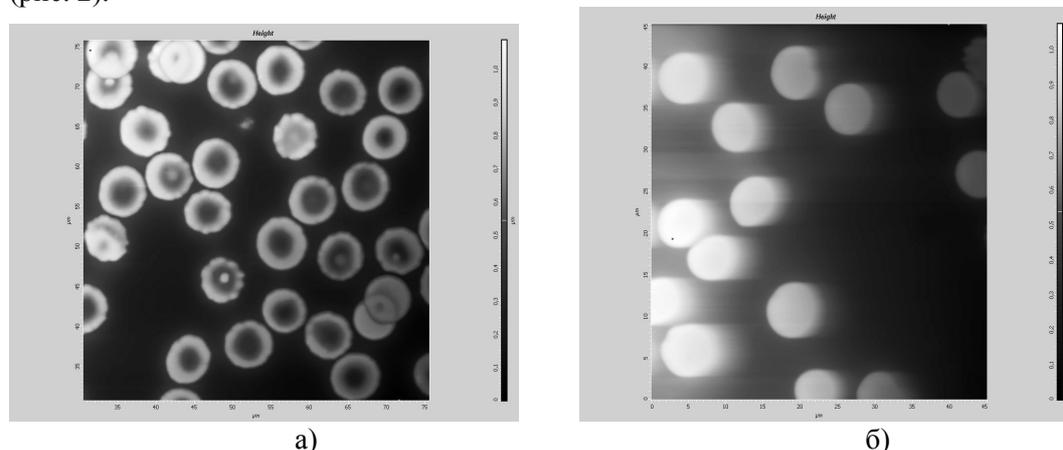


Рис. 2. Сканы эритроцитов крыс: а) опытная группа, б) контрольная группа.

На сканах эритроцитов крыс опытной группы прослеживались неровные контуры клеток (рис. 2а). В контрольной группе наблюдалась однородная по форме популяция дискоцитов (рис. 2б). По данным силовой спектроскопии, наночастицы железа распределены по периферии клетки, где заметно возрастал модуль упругости (точки 2, 3, 4, 6, 24, табл. 2).

Таблица 2

Упругость эритроцитов крыс при введении наножелеза, Па

Точки нанoidентирования	Контроль	Опыт
2	15,81±0,9*	24,97±1,84
3	16,07±0,05*	21,89±1,97
4	14,72±1,19	23,51±2,46
5	10,52±0,01	13,46±3,35
6	11,22±0,02*	29,92±0,1
7	16,75±1,09	20,32±1,45
8	14,38±0,83*	19,49±1,94
9	15,80±1,36*	29,26±3,36
10	11,00±2,22*	36,00±4,52
11	20,73±5,66	–
12	16,98±1,22	20,09±1,91
13	15,05±1,16*	21,41±2,15
14	14,69±0,94*	21,16±2,17
15	14,35±3,76	26,12±1,88
16	8,25	7,94
17	18,00±1,54	19,06±2,31
18	17,96±1,43	18,12±2,15
19	21,22±2,85*	28,95±2,57
20	10,1±2,57	18,25±5,54
21	–	–
22	46,65	25,65
23	15,99±2,84	23,48±0,64
24	14,97±1,51*	29,84±1,57

Примечания: *Статистическая значимость достоверности различий опытной группы по сравнению с данными контрольной группы при $p \leq 0,05$.

В области пэтора (точки 13, 14) зафиксировано достоверное возрастание модуля упругости до $21,41 \pm 2,15$ Па в эритроцитах опытной группы по сравнению с контролем, где он составлял $15,05 \pm 1,16$ Па. На сканах эта область выглядит более темной (рис. 2а). Полагаем, что это связано с конформационными перестройками гемоглобина и локализацией его в центре. В работе [3] показано, что контакт наночастиц с поверхностью мембраны приводит к их электрической инактивации и накоплению в адсорбционных слоях свободных радикалов, количество которых пропорционально передаваемому на мембрану эритроцитов заряду. Это указывает на то, что мембрана эритроцитов является более мощным акцептором электронов по сравнению с наночастицами. Исходя из этого, не исключено изменение функциональной активности эритроцитов крови при адсорбции на их поверхности наночастиц железа. Аккумуляция электронов на внешней поверхности эритроцитарной мембраны создает условия для внутриклеточной трансформации энергии. В ряде экспериментальных исследований установлено, что изменения упруго-механических свойств клеток создают условия для структурирования белково-образующего примембранного слоя с участием мембранно-ассоциированного гемоглобина [5, 8].

Таким образом, однократное введение металлоксидных наночастиц железа стимулирует дыхательную функцию крови, изменяет геометрический профиль эритроцитов, инициирует конформационные перестройки гемоглобина. В кровотоке увеличивается количество циркулирующих гиперхромных форм эритроцитов небольших размеров с повышенной упругостью.

Библиографический список

1. Андреев, Г.Б. Материалы, производимые по нанотехнологиям: потенциальный риск при получении и использовании [Текст] / Г.Б. Андреев, В.М. Минашкин, И.А. Невский, А.В. Путилов // Рос. хим. жур. им. Д.И. Менделеева. – 2008. – Т. ЛII, № 5. – С. 32–38.
2. Васильев, Н.В. Система крови и неспецифическая резистентность в экстремальных климатических условиях [Текст] / Н.В. Васильев, Ю.М. Захаров, Т.И. Коляда. – Новосибирск: Наука, 1992. – 257 с.
3. Ингель, Ф.И. Влияние наночастиц на каталитическую активность эритроцитов крови [Электронный ресурс] / Ф.И. Ингель, А.А. Стехин, Г.В. Яковлева, М.Г. Кочеткова // www.Rusnanoforum.ru.
4. Иржак, Л.И. Дыхательная функция крови в условиях гипероксии [Текст] / Л.И. Иржак, В.В. Гладилов, Н.А. Моисеенко. – М.: Медицина, 1985. – 176 с.
5. Казеннов, А.М. Структурно-биохимические свойства мембраны безъядерных эритроцитов [Текст] / А.М. Казеннов, М.Н. Маслова // Физиологический журнал СССР им. И.М.Сеченова. – 1987. – Т. 73, № 12. – С. 1587–1594.
6. Лабораторные методы исследования в клинике [Текст] / под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
7. Лебедев, Д.В. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа [Текст] / Д.В. Лебедев, А.П. Чукланов, А.А. Бухараев, О.С. Дружинина // Письма в ЖТФ. – 2009. – Т. 35. Вып. 8. – С. 54–61.
8. Петренко, Ю.М. Роль поверхностных зарядов в поддержании осмотической резистентности эритроцитов [Текст] / Ю.М. Петренко, Ю.А. Владимиров // Гематология и трансфузиология. – 1987. – №10. – С. 15–18.
9. Саркисов, Д.С. Общие закономерности компенсаторно-приспособительных реакций и их структурного обеспечения: материальные основы надежности биологических систем [Текст] / Д.С. Саркисов // Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций: руководство. – М.: Медицина, 1987. – С. 36–57.
10. Стародуб, Н.Ф. Гетерогенная система гемоглобина: структура, свойства, синтез, биологическая роль [Текст] / Н.Ф. Стародуб, В.И. Назаренко. – Киев: Наукова думка, 1987. – 200 с.
11. Bunn, H.F. Hemoglobin: molecular, genetic and clinical aspect [Text] / H.F. Bunn, B.G. Ferget. – Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. – 522 p.
12. Capella, B. Force-distances curves by atomic-force microscopy [Text] / B. Capella, G. Dietler // Surf. Sci. Rep. – 1999. – V. 34. – P. 1–104.
13. Chambers, E. Long circulating nanoparticles via adhesion on red blood cells: mechanism and extended circulation [Text] / E. chambers, S. Mitragotri // Exper. Biology and medicine. – 2007. – V. 232. – P. 958–966.
14. Hanava, T. Cytotoxicities of oxides, phosphates and sulfides of metal [Text] / T. Hanava, M. Kaga, Y. Itoh, T. Echirenya, H. Oguchi, M. Ota // Biomaterials. – 1992. – V. 13. – P. 20–24.
15. Li, N. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage [Text] / N. Li, C. Sioutas, A. Cho, D. Schmitz, C. Misra, J. Sempf // Environ. Health Perspect. – 2003. – V. 11, № 4. – P. 455–460.

16. Rotsch, C. Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy [Text] / C. Rotsch, K. Jacobson, M. Radmacher // Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Cell Biology. – 1999. – V.96. – P. 921–926.
17. Sneddon, I.N. The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile [Text] I.N. Sneddon // Int. J. Eng. Sci.– 1965. – V. 3. – P. 47–57.
18. Wilson, M.R. Interaction between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro [Text] / M.R. Wilson, J.H. Lightbody, K. Donaldson, J. Sales, V. Stone // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2002. – V. 184. – P. 172-179.
19. Wojcikiewicz, E. Force and Compliance Measurements on Living Cells Using Atomic Force Microscopy [Text] / E. Wojcikiewicz, X. Zhang, V. Moy // Biol. Proced. Online. – 2004. – V. 6(1). – P. 1–9.

© Скоркина М.Ю., Федорова М.З., Сладкова Е.А., Деркачев Р.В., Забияков Н.А., 2010

УДК 612.1

Т.Ф. Черняковская

МОДЕЛЬНАЯ ДЕСТРУКЦИЯ ЦИАНОБАКТЕРИЙ И ТКАНЕЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ ГИДРОЛИТИЧЕСКИМ КОМПЛЕКСОМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Исследована сукцессия аэробных и факультативно анаэробных сапротрофных прокариот в условиях повышенного увлажнения на специально разработанной установке. Деструкцию *Anabena* и *Phragmites australis* осуществляет однотипное «бактериальное ядро». Комплекс микроорганизмов на тростнике включает также актиномицеты, дрожжи и мицелиальные микромицеты.

Ключевые слова: *Anabena*, *Phragmites australis*, дрожжи, гидролитический комплекс прокариот, мортмасса, моделирование процесса деструкции.

T.F. Tshernyakovskaya

MODEL DESTRUCTION OF CYANOBACTERIUMS AND HIGH PLANTS TISSUES BY HYDROLYTIC COMPLEX OF MICROORGANISMS

Succession of aerobic and elective-anaerobic saprotroph procaryots was researched in increased moist condition by using special installation. Destruction of *Anabena* and *Phragmites australis* are carried out by equal «bacterial substance». Actinomycetes, yeasts and mycelial micromycetes are included in complex of microorganisms on *Ph. australis* too.

Key words: *Anabena*, *Phragmites australis*, yeasts, hydrolytic complex of procaryots, model destruction.

Микробиологическая деградация растительной мортмассы – глобальный биогеохимический процесс, определяющий в конечном итоге состояние наземного покрова и атмосферы Земли. Главный маршрут деградации растительного покрова – разложение скелетного материала наземных растений, представленного лигноцеллюлозой [6,8]. В наземных экосистемах этот процесс активно изучается [2,6,8]. Данные о микробиологической деструкции растительной мортмассы в водных экосистемах до сих пор остаются малоизученными. В этой связи особый интерес представляет деградация прокариотных фотосинтезирующих организмов – цианобактерий, широко распространенных в водных экосистемах и почвах.

Химический состав растений включает 2-15% белка и 10% растворимых соединений, 10-60% целлюлозы, 10-30% гемицеллюлозы, 5-30% лигнина. Таким образом, в растительной мортмассе среди углеродсодержащих соединений преобладает лигноцеллюлоза. Она составляет около ½ всего углерода, ассимилированного растениями [6,7]. Клеточная стенка цианобактерий включает аминокислоты, жирные кислоты, липосахариды и др. Однако основным ее компонентом является муреин (вещество из группы пептидогликанов). Поверх оболочки клетки могут быть покрыты слизью, состоящей из набухающих в воде полисахаридов [4,9].

Целью настоящей работы является изучение сукцессии аэробных и факультативно анаэробных сапротрофных прокариот, а также дрожжей при разложении мортмассы прибрежно-водного