

DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-2-804

УДК 612.089



Научная статья

ОЦЕНКА ГЕМОСОВМЕСТИМОСТИ НАНОСТРУКТУР В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ IN VITRO

Е.В. Невзорова, В.В. Немцова, А.А. Беляев

Обоснование. Важной проблемой оценки наночастиц является выявление мест-объектов, позволяющих оценить повреждающие эффекты *in vitro*.

Цель. Оценить эритроциты крови в качестве модельной системы *in vitro* как оригинального «клеточного дозиметра» эффектов наночастиц и уникальной модели гемосовместимости наноструктур.

Материалы и методы. В работе использованы коллоидные растворы наночастиц серии «Таунит», «Таунит-М», «Таунит-МД». Основной задачей авторы определили изучение влияния ζ -потенциала наночастиц на агрегацию эритроцитов по данным анализа скорости оседания эритроцитов. При расчете скорости оседания эритроцитов применялся метод Вестергерена.

Результаты. Установлена зависимость агрегации эритроцитов от величины ζ -потенциала наночастиц по данным анализа скорости оседания эритроцитов. Выявлено, что наночастицы марки «Таунит-МД», имеющие наибольший ζ -потенциал, препятствовали агрегации эритроцитов, таким образом не влияя на показатели скорости оседания эритроцитов и обуславливали их гемосовместимость. Наночастицы марки «Таунит», «Таунит-М», имеющие низкие значения ζ -потенциалов, вызывали нестабильность коллоидной системы крови и тенденцию эритроцитов к агрегации, что обуславливало значительное повышение показателей скорости оседания эритроцитов. ROC-анализ показал чувствительность теста «Скорость оседания эритроцитов» 92,5%, специфичность 100,0%.

Заключение. Величина ζ -потенциала наночастиц влияет на агрегацию эритроцитов, что определяется данными анализа скорости оседания эритроцитов. Данное исследование доказывает, что эритроциты крови человека являются уникальными биологическими дозиметрами, которые чувствительны к действию наночастиц, а их использование в качестве

тест-объекта позволяет оценить гемосовместимость наноструктур в модельных системах *in vitro*.

Ключевые слова: наночастицы; ζ -потенциал; эритроциты

Для цитирования. Невзорова Е.В., Немцова В.В., Беляев А.А. Оценка гемосовместимости наноструктур в модельной системе *in vitro* // *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*. 2024. Т. 16, №2. С. 28-49. DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-2-804

Original article

EVALUATION OF THE HEMOCOMPATIBILITY OF NANOSTRUCTURES ON IN VITRO MODEL SYSTEMS

E.V. Nevzorova, V.V. Nemtsova, A.A. Belyaev

Background. An important issue in the evaluation of nanoparticles is the manifestation of test objects that allow the evaluation of damaging effects *in vitro*.

Purpose. Evaluate red blood cells as an *in vitro* model system as the original “cellular dosimeter” of the effects of nanoparticles and the unique model of the hemocompatibility of nanostructures.

Materials and methods. In this work colloidal solutions of nanoparticles of the “Taunit”, “Taunit-M”, “Taunit-MD” series were used. The main task determined by the authors is to study the influence of the ζ -potential of nanoparticles on aggregation by analyzing the erythrocyte sedimentation rate. The Westergren method was used for the evaluation of the erythrocyte sedimentation rate.

Results. The relationship between the aggregation of erythrocytes and the values of the ζ -potential of the nanoparticles was established according to the data of the test of the erythrocyte sedimentation rate. It was shown that the nanoparticles of the “Taunit-MD” series possessing the greatest ζ potential, prevented the aggregation of erythrocytes without changing the erythrocyte sedimentation rate, which proves their hemocompatibility. Nanoparticles of “Taunit”, “Taunit-M” series possessing low ζ -potential, caused instability of the colloidal system of blood and caused the tendency of erythrocytes to form aggregations which was revealed by a considerable increase in the rate of erythrocyte sedimentation. The ROC test showed the sensitivity of the “Erythrocyte sedimentation rate” test at 92.5%, and its specificity at 100.0%.

Conclusion. The value of the ζ -potential of the nanoparticles is related to the aggregation of the erythrocytes, which is revealed by the test of the erythrocyte

sedimentation rate. This research proves that human red blood cells are the unique biological dosimeters that are sensitive to the action of nanoparticles and that their use as test objects allows to examine the hemocompatibility of nanostructures on in vitro model systems.

Keywords: nanoparticles; ζ -potential; erythrocytes

For citation. Nevzorova E.V., Nemtsova V.V., Belyaev A.A. Evaluation of the Hemocompatibility of Nanostructures on In Vitro Model Systems. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2024, vol. 16, no. 2, pp. 28-49. DOI: 10.12731/2658-6649-2024-16-2-804

Введение

Углеродные нанотрубки (УНТ) – нитевидные наночастицы (НЧ), содержащие протяженную внутреннюю полость. НЧ УНТ представляют собой аллотропную модификацию углерода цилиндрической формы. В последнее десятилетие сфера применения УНТ значительно расширилась – их используют в строительстве, энергетике, автомобилестроении, электронике, композитных материалах. Объем потребления углеродных наноматериалов в России составляет 380-390 кг в год, из которых 91% приходится на нанодиамазы, на долю фуллеренов – 8%, а на долю углеродного нановолокна и нанотрубок – около 1%. При этом среди общего количества синтезируемых трубок 98% приходится на УНТ [1-4].

В связи с широким использованием УНТ, биобезопасность и биосовместимость углеродной нанопродукции вызывает настороженность, что указывает на актуальность данной проблемы и на необходимость ее дальнейшего изучения.

Была исследована публикационная активность российских и зарубежных специалистов в мировом потоке публикаций по следующим направлениям: наноматериалы, нанобиология, наномедицина.

Во многих исследованиях, представленных в базе данных Научной электронной библиотеке eLIBRARY.RU поднимался вопрос о влиянии НЧ на организм человека [5-8, 12].

Рассмотрены особенности транскутанного поступления НЧ в организм человека. Отмечено, что НЧ различных размеров могут отличаться своими физико-химическими свойствами и соответственно своим влиянием на биологические системы [8].

Особый интерес ученых вызывает влияние НЧ на клетки крови. [5-7]. Исследованиями авторов Малиновская Ю.А., Коваленко Е.И., Ковшова и др. [6], Шароновой Н.В. [12] показана значимость оценки возможного

токсического действия НЧ на компоненты крови на этапе доклинических исследований.

В литературных источниках, размещенных в базе данных «Scopus» и «Web of Science» представлены материалы о химических путях получения наноматериалов и подчеркивается их роль в их биомедицинских приложениях [2, 14], изучаются химические пути воздействия на массив НЧ [3], процессы окисления коллоидных НЧ [18], дана оценка роли наноформы в нейротоксичности различных металлов [1].

В ряде исследований проводились эксперименты *in vivo* на бактериях [21], растениях [24], и животных [1]. Так, в исследованиях Heloise P.F. с соавт. [15] было показано, что при введении НЧ в условиях эксперимента лабораторным мышам аэрозольным и пероральным путем, от 4 до 23% (зависит от типа и размера НЧ) введенных наночастиц обнаруживались в кровотоке и оседали во внутренних органах, нарушая их функционирование.

Проведен анализ литературных источников, посвященных исследованиям влияния НЧ на эритроциты [5, 9-11].

Созарукова М.М. и др. [10], Торопова Я.Г. [11], авторы Ефимова С. и др. [5] полагают, что НЧ способствуют эритроцитозу эритроцитов. Эритроцитоз, считают авторы, является перспективной моделью для оценки нанотоксичности.

В исследованиях Ремпель С.В., Александровой Н.Н., Кузнецовой Ю.В. [9] методами оптической микроскопии изучено взаимодействие НЧ с эритроцитами периферической крови. Показано, что результат взаимодействия зависит от размера и заряда частиц.

Авторы Heloise Pöckel Fernandes, Carlos Lenz Cesar, Maria de Lourdes Barjas-Castro [15], Pavan C., Turci F., Tomatis M. И др. [25] изучали электрические свойства эритроцитов и окружающую среду реакции. Было доказано, межмолекулярные силы участвуют в агрегации при сгущении клеток, происходящем тогда, когда сила агрегации больше силы отталкивания. Показано, сила отталкивания генерируется отрицательными зарядами на поверхности эритроцитов, которые возникают из-за присутствия карбоновой группы сиаловых кислот в клеточной мембране; эти заряды создают отталкивающий электрический дзета-потенциал между клетками.

В исследованиях Megha N. Karemore, Jasmine G. Avari [20] определен дзета-потенциал эритроцита и его ассоциация с морфологическими изменениями. Электрокинетический потенциал измеряли с помощью системы Zeta meter System 4.0, оснащенной программным обеспечением zetameter-ZM4DAQ, с использованием микроскопически полученных видеозображений.

Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) используется в медицинской практике как индикатор воспаления [23]. В то же время СОЭ является результатом сложного взаимодействия нескольких факторов, из которых наиболее важными являются: количество и поверхностный заряд эритроцитов, белковый состав плазмы и вязкость крови. В крови здорового человека эритроциты, взвешенные в плазме, имеют минимальную скорость оседания. Их агрегация происходит в результате проявления электростатических сил, приводящих к образованию комплексов, которые образуют монетные столбики и оседают. В здоровом организме эритроциты заряжены отрицательно и не агрегируют друг с другом [13].

Авторы Sora Yasri, Viroj Wiwanitkit [23] сообщают о наблюдениях в лабораторном эксперименте по проверке влияния НЧ цинка на результаты СОЭ. Всего в эксперименте было использовано 100 образцов крови. Наблюдение показало, что НЧ, добавленные в кровь *in vitro* могут изменить значения СОЭ в 2,4 раза.

Тем не менее, в литературных источниках мы не нашли сведений о зависимости ζ -потенциала системы кровь-наночастицы и скорости оседания эритроцитов. В связи с чем, исследование эритроцитов крови человека для оценки степени воздействия углеродных наноматериалов на кровь является весьма актуальным.

Цель исследования заключается в оценке возможности использования эритроцитов крови человека в качестве модельной системы *in vitro* как оригинального «клеточного дозиметра» эффектов ксенобиотиков и уникальной модели гемосовместимости наноструктур.

Для реализации цели сформулированы следующие задачи:

1. Определить ζ -потенциал НЧ УНТ типов «Таунит-МД», «Таунит», «Таунит-М».

2. Изучить влияние ζ -потенциала НЧ УНТ типов «Таунит-МД», «Таунит», «Таунит-М» на агрегацию эритроцитов по данным анализа скорости оседания эритроцитов для оценки гемосовместимости наноструктур в модельных системах *in vitro*.

3. Произвести вычисление клинической информативности и прогностичности теста «СОЭ» для оценки гемосовместимости наночастиц. Методом ROC-анализа определить чувствительность, специфичность, критериальные значения показателя «СОЭ».

В данном исследовании в качестве отдельной системы *in vitro* для оценки гемосовместимости наноструктур выбраны эритроциты человека. Учитывая то, что эритроциты человека являются наиболее доступным

носителем биологических мембран, которые характеризуются упругостью и высокой (относительно большинства других клеток) устойчивостью к физическим воздействиям, а также являются более простым элементом для выделения из цельной крови, благодаря своему несложному строению (отсутствие ядра и внутриклеточных органелл), именно их было целесообразно использовать в качестве исследуемого объекта для того чтобы облегчить дальнейшую интерпретацию полученных результатов.

Проведенный систематический обзор показал, что среди исследуемой литературы нет исследований, посвященных воздействию НЧ УНТ типов «Таунит-МД», «Таунит», «Таунит-М» на агрегативную способность эритроцитов, исходя из значения ζ -потенциала на их поверхности.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на базе специализированной медико-биологической лаборатории Медицинского института ТГУ имени Г.Р. Державина. Результаты исследований получены с использованием оснащения центра коллективного пользования научным оборудованием ТГУ имени Г.Р. Державина.

Краткая характеристика наночастиц

В работе использовались углеродные нанотрубки, предоставленные Центром коллективного пользования научным оборудованием по направлению «Получение и применение полифункциональных наноматериалов» ТГТУ, г. Тамбов (www.tstu.ru)

Для анализа исходных УНТ использовали:

1. Метод просвечивающей электронной микроскопии (ЭМ), позволяющий исследовать дифракцию электронов. Для анализа применялись просвечивающие электронные микроскопы JEM-1011 (JEOL, Япония) и LEO 912AB (Carl Zeiss, Германия);

2. Метод ЭМ с рентгенофлуоресцентным анализом. Для анализа применялись сканирующие электронные микроскопы Neon 40 и Merlin (Carl Zeiss, Германия).

Был произведен расчет ζ -потенциала УНТ с использованием комбинации электрофореза и лазерного измерения скорости, основанного на эффекте Доплера; определена скорость частицы в жидкости под действием электрического поля, а затем рассчитан ее ζ -потенциал с применением известных констант образца – вязкости и диэлектрической проницаемости.

Данные исследования обрабатывались при помощи специализированного программного обеспечения «Dispersion Technology Software» («Malvern Instruments Ltd.», UK).

В работе использовались три типа многостенных углеродных нанотрубок производства ООО «Нанотехцентр», г. Тамбов:

1. Углеродные нанотрубки (УНТ) серии «Таунит» (рис. 1)

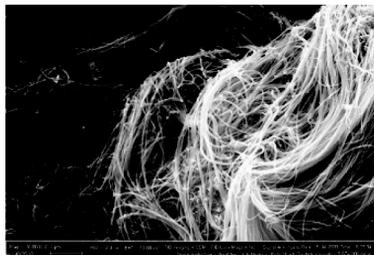


Рис. 1. Углеродные нанотрубки (УНТ) серии «Таунит».
(<http://www.nanotc.ru/productions/87>)

Характеристика: Внешний диаметр 20-50 нм; Внутренний диаметр 10-20 нм; Длина ≥ 2 мкм; Общее количество примесей ≤ 1 %; Удельная поверхность ≥ 160 м²/г; Насыпная плотность 0,3-0,6 г/см³; ζ -потенциал углеродных нанотрубок $-18,0 \pm 3,1$ мВ. Образец получен методом газофазного окисления углеродных нанотрубок в парах азотной кислоты при 140 °С, степень Sf функционализации COOH-группами составляет 0,7 ммоль/г.

2. Углеродные нанотрубки (УНТ) серии «Таунит – М» (рис. 2)

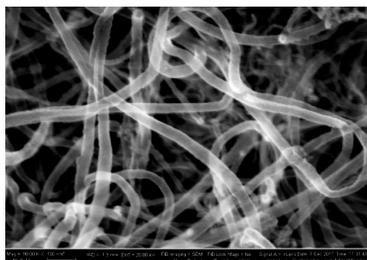


Рис. 2. Углеродные нанотрубки (УНТ) серии «Таунит – М»
(<http://www.nanotc.ru/productions/87>)

Характеристика: Внешний диаметр 10-30 нм; Внутренний диаметр 5-15 нм; Длина ≥ 2 мкм; Общее количество примесей ≤ 1 %; Удельная поверхность ≥ 270 м²/г; Насыпная плотность 0,025-0,06 г/см³; ζ -потенциал углеродных нанотрубок $-15,0 \pm 2,5$ мВ. Образец получен методом газофазного окисления углеродных нанотрубок в парах азотной кислоты при 140 °С, степень Sf функционализации COOH-группами составляет 0,9 ммоль/г.

3. Углеродные нанотрубки (УНТ) серии «Таунит – МД» (рис. 3)

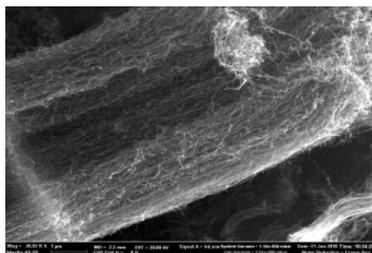


Рис. 3. Углеродные нанотрубки (УНТ) серии «Таунит – МД».
(<http://www.nanotc.ru/productions/87>)

Характеристика: Внешний диаметр 8-30 нм; Внутренний диаметр 5-15 нм; Длина ≥ 20 мкм; Общее количество примесей $\leq 1\%$; Удельная поверхность ≥ 270 м²/г; Насыпная плотность 0,025-0,06 г/см³; ζ -потенциал углеродных нанотрубок $-31,0 \pm 4,1$ мВ. Образец получен методом газовой фазы окисления углеродных нанотрубок в парах азотной кислоты при 140 °С, степень Sf функционализации COOH-группами составляет 0,6 ммоль/г.

Приготовление исследуемых агентов

В работе использованы коллоидные растворы НЧ УНТ серии «Таунит», «Таунит – М», «Таунит – МД» в 0,9%-м растворе NaCl. Для выявления дозозависимости оказываемых эффектов исследовали коллоидные растворы УНТ в концентрациях 0,1; 1,0 и 10,0 мг/л. Объем выборки (n) в каждой из исследуемых групп – восемь образцов.

Приготовление коллоидного раствора НЧ УНТ. Коллоидный раствор УНТ готовили на основе 0,9%-м раствора NaCl (ФР, группа ФР). Навески НЧ (от 1 мг до 10 г с шагом в 10 раз) взвешивали при помощи аналитических весов ViBRA HT (Shinko Denshi, Japan, точность $\pm 0,0001$ г), всыпали в предварительно приготовленную емкость с водой объемом 1 л и перемешивали стеклянной палочкой в течение 20 секунд.

Все НЧ перед измерением разбивались в ультразвуковой ванне (ЗАО «РЭЛТЭК», Россия) в течение 15 мин для достижения однородной суспензии. МУН диспергировали в 0,9%-м растворе NaCl при помощи ультразвуковой обработки, продолжительность гомогенизации – до 10 минут, мощность – 300 Вт, частота – 23 кГц с помощью ультразвукового диспергатора Hielscher UIP1000hd (Hielscher Ultrasonics, Германия). 0,9% раствор NaCl для контрольных экспериментов обрабатывали аналогичным образом без добавления наночастиц. Степень диспергирования НЧ

анализировали с использованием метода динамического рассеяния света (ДРС), (DLS – Dinamic light scattering), также известного как фотонная корреляционная спектроскопия (PCS – Photon correlation spectroscopy). Измерения проводили с помощью прибора ZetasizerNano (Malvern, Великобритания).

Приготовление инкубационной взвеси эритроцитов и УНТ. Исследование проводили на гепаринизированной цельной крови человека, для чего готовили инкубационную взвесь: к 1 мл крови при постоянном перемешивании добавляли 1 мл раствора исследуемых 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).

Исследование гемосовместимости углеродных наночастиц по анализу скорости оседания эритроцитов (СОЭ) [22]

Цельная кровь здоровых доноров, полученная из локтевой вены и стабилизированная цитратом натрия, представлена как объект исследования при вычислении значения СОЭ. При расчете скорости оседания эритроцитов применялся метод Вестергрена (в пробирке), который является международным методом определения данного показателя. Для исследования по методу Вестергрена использовали венозную кровь, взятую с ЭДТА (1,5 мг/мл) и затем разведённую физиологическим раствором в соотношении 4:1. Реакция происходила в особых пробирках Вестергрена с просветом 2,4-2,5 мм и шкалой, градуированной в 200 мм. СОЭ рассчитывался в мм за 1 час. Кровь здоровых доноров, взятая из локтевой вены и стабилизированная цитратом натрия, использовалась в качестве контроля.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с помощью программы «STATISTICA 10.10». Поскольку распределение значений переменных отличалось от нормального (оценка проводилась по критерию Шапиро-Уилка), использовали непараметрические методы статистики. Данные представлены как Медиана (Md), нижняя квартиль G25 и верхняя квартиль G75. Оценку статистической значимости различий между группами проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса, рангового дисперсионного анализа [17]. Критерий уровня значимости при проверке статистических гипотез (p) принимался равным 0,05. Корреляцию количественных показателей оценивали посредством анализа с использованием коэффициента ранговой корреляции (r) Spearman.

Результаты исследования

Данное исследование ставит вопрос о гемосовместимости УНТ типов «Таунит-МД», «Таунит», «Таунит-М», которые имеют отличные друг от друга физико-химические характеристики. Анализ возможных неблагоприятных отклонений от нормы в крови под воздействием НЧ, являлся основной целью данного тестирования.

В результате исследования изучено влияние физических свойств НЧ на кровь, в частности, влияние ζ -потенциала НЧ на агрегацию эритроцитов, которую определяли по скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Изучение влияния физических свойств УНТ типов «Таунит-МД», «Таунит», «Таунит-М» на организм человека проводилось впервые.

Было выяснено, все три типа УНТ имели отрицательное значение ζ -потенциала. Минимальный ζ -потенциал (-15,0 мВ) был обнаружен у НЧ марки «Таунит-М». У НЧ марки «Таунит» наблюдался ζ -потенциал равный -18,0 мВ. НЧ марки «Таунит-МД» имели максимальный ζ -потенциал (-31,0 мВ), что определило самую высокую стабильность их суспензии из всех рассматриваемых материалов НЧ.

Дана оценка степени воздействия исследуемых НЧ на кровь по данным анализа скорости оседания эритроцитов (табл. 1).

Таблица 1.

Результаты определения СОЭ после инкубации с исследуемыми УНТ (Md [Q₂₅; Q₇₅], n = 24)

Скорость оседания эритроцитов (мм/ч)	Доза, мг/мл	Группы				Критерий Краскелла-Уоллиса
		Контроль n = 8 (1)	УНТ марки «Таунит МД» n = 8 (2)	УНТ марки «Таунит» n = 8 (3)	УНТ марки «Таунит М» n = 8 (4)	
0,1		7,0 (3,0-8,0)	7,0 (3,0-8,0)	8,0 (4,0-9,0)	7,0 (3,0-8,0)	P ₁₋₄ >0,05
1,0		7,0 (3,0-8,0)	8,0 (5,0-10,0)	24,0 (22,0-26,0)	23,0 (21,0-25,0)	77,64 P ₁₋₄ =0,00
10,0		7,0 (3,0-8,0)	гемолиз	гемолиз	гемолиз	-

Примечание:

P₁₋₄>0,05 – недостоверные различия между группами УНТ и контрольной группой

P₁₋₄=0,00 – достоверные различия между группами УНТ и контрольной группой

Как показали исследования, контрольное значение СОЭ находилось в диапазоне нормальных значений [33].

При воздействии наночастиц в минимальной дозе 0,1 мг/мл во всех группах достоверных изменений не происходило ($P_{1-4} > 0,05$).

При воздействии наночастиц в дозе 1,0 мг/мл характеристики скорости оседания эритроцитов различных экспериментальных групп значительно отличаются друг от друга ($P_{1-4} = 0,00$).

В сравнении с группой контроля (Md 7,0 [Q₂₅3,0; Q₇₅8,0]) наночастицы марки «Таунит-МД», имеющие максимальный ζ-потенциал (-31,0 Мв) в дозе 1,0 мг/мл оказывали слабое влияние на СОЭ (Md 8,0 [Q₂₅5,0; Q₇₅10,0]).

Наночастицы марки «Таунит» имеющие ζ-потенциал равный -18,0 Мв в дозе 1,0 мг/мл оказывали значительное влияние на СОЭ, повышая ее (Md 24,0 [Q₂₅22,0; Q₇₅26,0]).

Наночастицы марки «Таунит М», имеющие минимальный ζ-потенциал (-15,0мВ) в дозе 1,0 мг/мл также оказывали значительное влияние на СОЭ, повышая ее (Md 23,0 [Q₂₅21,0; Q₇₅25,0]).

При воздействии наночастиц в максимальной дозе 10,0 мг/мл во всех группах наблюдался гемолиз эритроцитов

Таким образом, исследованиями установлены статистически значимые различия влияния углеродных наночастиц МУНТ типов «Таунит-МД», «Таунит», «Таунит-М» на агрегативную способность эритроцитов, исходя из значения ζ-потенциала на их поверхности.

Данные исследования подтверждены оценкой корреляционной зависимости показателей СОЭ и ζ-потенциала с использованием непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена (рис. 4).

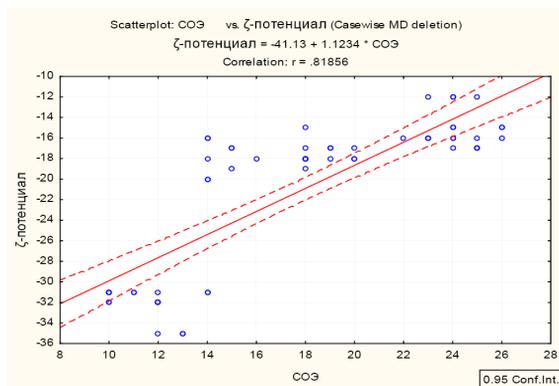


Рис. 4. Оценка корреляционной зависимости показателей СОЭ и ζ-потенциала с использованием непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

В ходе анализа корреляционной зависимости с использованием непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена было выяснено, что существует прямая зависимость между значениями ζ -потенциала и СОЭ ($r=0,81$).

Было произведено вычисление клинической информативности и прогностичности теста «СОЭ» для оценки гемосовместимости наночастиц с определением чувствительности, специфичности, пропорций и позитивных/негативных значений для всех возможных критических значений, которое было рассчитано методом ROC-анализа (receiver operating characteristic analysis).

ROC-анализ показал следующее:

1. Площадь под характеристической кривой (AUC) модели «СОЭ» равна 0,995 ($p < 0,001$), что соответствовало «отличному» уровню прогноза по экспертной шкале AUC;
2. Диагностический порог теста составил $>14,0$ мм/л мм.рт.ст. Значения выше прогнозировали вероятность агрегации эритроцитов;
3. Чувствительность теста составила 92,5%;
4. Специфичность теста составила 100,0% (рис. 5).

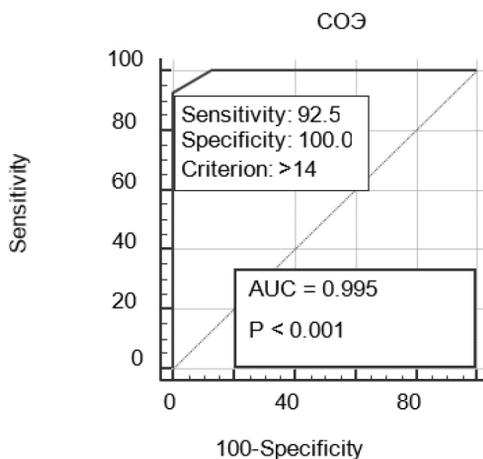


Рис. 5. Анализ кривой модели «СОЭ» на основе ROC-анализа (Receiver operating characteristic analysis).

Обсуждение

Среди физико-химических признаков, ответственных за так называемую «биобезопасность НЧ», ключевая роль отводится поверхностному

заряду НЧ, оцениваемому с помощью ζ -потенциометрии [16]. Дзета-потенциал (электрокинетический потенциал) НЧ описывает состояние протонирования силанолов, которые, в свою очередь, определяют взаимодействие с клеточными мембранами. Связь между частицами дисперсной системы, а именно ее характер и степень взаимодействия, определяется величиной ζ -потенциала. Высокий потенциал гарантирует стабильность, при которой раствор или дисперсия будут менее подвержены агрегации, при условии малого размера частиц и молекул, из которых он будет состоять. Неустойчивость дисперсии будет расти, если ζ -потенциал недостаточно высокий, при этом притяжение будет больше отталкивания.

За границу между устойчивой и неустойчивой суспензией принимаются значения ζ -потенциала +30 мВ и -30 мВ. Системы с ζ -потенциалом более положительным, чем +30 мВ или более отрицательным, чем -30 мВ считаются по мнению McNamee А.Р. и соавт. [19] стабильными. Таким образом, ζ -потенциал является мерой устойчивости коллоидного раствора.

При оценке цитотоксического действия МУНТ на эритроциты ключевым фактором является способность красных кровяных клеток связывать их на своей мембране и, возможно, поглощать их. По утверждению авторов Megha N. K., Jasmine G. A. [20] эти процессы зависят от числа слоев МУНТ, их диаметра и длины, ζ -потенциала, степени агрегации, стабильности приготовленной дисперсии и некоторых других показателей.

Авторы Fruchtman Y., Perry Z.H., Moser A. [13] утверждают, что агрегация эритроцитов зависит от их электрических свойств и белкового состава плазмы крови. Эритроциты в норме заряжены отрицательно (ζ -потенциал эритроцитов), т.к. на их эритроцитарной мембране находятся заряженные группы сиаловых кислот, которые обеспечивают взаимное отталкивание эритроцитов и поддержание их во взвешенном состоянии. При воздействии эндогенных или экзогенных факторов эритроциты теряют способность отталкиваться друг от друга, что и ведет к их агрегации, в ходе которой образуются так называемые «монетные столбики». Масса монетных столбиков увеличивается величину оседающих частиц, тем самым ускоряя оседание.

Чтобы получить молекулярное представление о роли ζ -потенциала НЧ в отношении агрегации эритроцитов, было проведено исследование зависимости агрегации эритроцитов от величины ζ -потенциала УНТ марки «Таунит», «Таунит-М» и «Таунит-МД» по данным анализа скорости оседания эритроцитов.

Скорость оседания эритроцитов – неспецифический лабораторный показатель крови, отражающий соотношение фракций белков плазмы. Как

правило, превышение нормы свидетельствует о нарушении электрохимической структуры крови, вследствие чего патологические белки (фибриногены) присоединяются к эритроцитам.

Наименьший ζ -потенциал, определяющий нестабильность системы, имели НЧ марки «Таунит» и «Таунит М». При применении данного типа НЧ в дозе 0,1 мг/мл, происходило значительное повышение СОЭ. Этот феномен связан с качеством функционального покрытия НЧ, которое содержит множество активных групп, таких как $-\text{COO}^-$ и $-\text{NH}_3^+$, обладающих способностью активно связываться с мембранами эритроцитов, обуславливая, таким образом их агрегацию.

Как отмечалось выше, НЧ УНТ марки «Таунит МД» имели наибольший ζ -потенциал (-31,0 мВ.), величина которого выходила за границы значений, отвечающих за нестабильность системы. НЧ этой марки обладали высокой стабильностью коллоида, что тормозило процесс агрегации, в отличие от НЧ марок «Таунит» и «Таунит М». Благодаря стабильности коллоида, взаимное отталкивание клеток и частиц было слабым, поэтому статистически важных различий в показателях СОЭ в контроле и после взаимодействия с НЧ в дозе 1,0 мг/мл не наблюдалось. Это явление также можно объяснить тем, что функциональное покрытие НЧ марки «Таунит-МД» представлено цилиндрическими УНТ, поверхность которых является малодефектной. Существующие на данной поверхности дефекты имеют центры, которые являются наиболее реакционноспособными при функционализации, так как они состоят из выступающих атомов углерода, которые находятся в состоянии sp^3 -гибридизации. Поэтому из рассматриваемых материалов «Таунит-МД» имел наименьшие значения степеней карбоксилирования, наибольший ζ -потенциал, высокую стабильность коллоида и не проявлял тенденции к агрегации.

Заключение

Проведенное исследование влияния физических свойств углеродных нанотрубок типов «Таунит МД», «Таунит», «Таунит М» на агрегационную способность эритроцитов, так же расчет полученных результатов, подтверждают, что наночастицы изменяют агрегативную способность эритроцитов, исходя из значения ζ -потенциала на их поверхности.

НЧ УНТ «Таунит МД» препятствуют агрегации тромбоцитов, что обуславливает их гемосовместимость. Применение УНТ марки «Таунит» и «Таунит М» провоцировали повышение показателя СОЭ в цельной крови человека, что предположительно подтверждает наличие токсического эффекта.

Подводя итоги, можно сказать, что эритроциты являются уникальными биологическими дозиметрами, которые чувствительны к действию ксенобиотиков, а также позволяют оценить гемосовместимость наноструктур в модельных системах *in vitro*.

Тест-модель оценки основных физиологических показателей эритроцитов *in vitro* дополняет и оптимизирует методические рекомендации по выявлению наночастиц, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека, что является в настоящее время весьма актуальным.

Заключение комитета по этике. Исследование было проведено в соответствии с принципами положения Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board).

Информированное согласие. Информированное согласие было получено от всех субъектов, участвовавших в исследовании.

Письменное информированное согласие на публикацию. Письменное информированное согласие было получено от пациентов на публикацию этой статьи.

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информация о спонсорстве. Исследование не имело спонсорской поддержки, авторы не получали гонорар за работу.

Список литературы

1. Анциферова А.А. и др. Взаимосвязи между эффектами наночастиц Ag и Ag-соли на поведенческие и когнитивные функции мышей и старение. // Отчеты по нанобиотехнологиям. 2022, Т. 17. Выпуск 6. С. 857-865. <https://doi.org/10.1134/S2635167622340018>
2. Беспалов А.В. Получение композиционных материалов на основе наночастиц серебра и водорастворимых полимеров и исследование их биологической активности // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. 2015. № 11.3. С. 1219-1224. <https://doi.org/10.12731/wsd-2015-11.3-1219-1224>
3. Вовк Н.А., Тархов М.А., Порохов Н.В. и др. Гидромеханическое воздействие на массив горизонтально выровненных углеродных нанотрубок // Отчеты по нанобиотехнологиям. 2022. Т. 17. С. 774-779. <https://doi.org/10.1134/S2635167622060180>
4. Окисление многослойных углеродных нанотрубок в парах перекиси водорода: закономерности и эффекты / Дьячкова Т.П., Хан Ю.А., Орлова Н.В.,

- Кондрашов С.В. // Вестник Тамбовского государственного технического университета. 2016. Т. 22. № 2. С. 323-333.
5. Ефимова С. и др. Редкоземельные ортованадатные наночастицы запускают Са²⁺-зависимый эриптоз // Нанотехнологии. № 20. Т. 34. 2023. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/acbb7f>
 6. Малиновская Ю.А., Коваленко Е.И., Ковшова и др. Цитотоксичность и гемосовместимость рIga наночастиц, нагруженных доксорубицином // Российский биотерапевтический журнал. 2020. Т. 19. № 1. С. 71-80.
 7. Присный А.А., Моисеева А.А., Скворцов В.Н. Сравнительный анализ влияния фторхинолонов на лейкограмму крови цыплят // Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture. 2020. №2. С. 11-24.
 8. Кашуба Н.А. О подходах к оценке влияния наночастиц на организм человека // Гигиена и санитария. 2020. Т. 99. № 5. С. 443-447.
 9. Влияние размера и заряда нестехиометрических наночастиц сульфида серебра на их взаимодействие с клетками крови / Ремпель С.В., Александрова Н.Н., Кузнецова Ю.В., Герасимов Е.Ю. // Неорганические материалы. 2016. Т. 52. № 2. С. 131.
 10. Созарукова М.М., Савинова Е.А., Проскурнина Е.В. Радикал-продуцирующая активность нейтрофилов крови в присутствии наночастиц диоксида церия // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2022. № 12. С. 37-41.
 11. Торопова Я.Г., Горшкова М.Н., Моторина Д.С., Влияние наночастиц на основе оксида железа, модифицированных различными оболочками, на генерацию активных форм кислорода стимулированными клетками крови человека в условиях *in vitro* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2021. Т. 57. № 4. С. 310-319.
 12. Шаронова Н.В., Свирщевская Е.В., Попов А.А. и др. Взаимодействие наночастиц *siFe* с эпителиальными и лимфоидными клетками // Биоорганическая химия. 2020. Т. 46. № 6. С. 736-745.
 13. Fruchtman Y., Perry Z.H., Moser A. Is there still a place to use erythrocyte sedimentation rate in the 21st century // *Harefuah*. 2019. Vol. 158(11). P. 732-736.
 14. Gabriel C Lavorato et al. Redox phase transformations in magnetite nanoparticles: impact on their composition, structure and biomedical applications // *Nanotechnology* 2023. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/acb943>
 15. Heloise P.F., Carlos L.C., Barjas-Castro M. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation // *Rev bras hematol hemoter*. 2011. Vol. 33(4). P 297-301. <https://doi.org/10.5581/1516-8484.20110080>

16. Karemore M.N., Avari J.G. Zeta potential as a novel diagnostic tool for pre-eclampsia // *Pregnancy Hypertension*. 2018. Vol. 13. P. 187-197. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.06.014>
17. Kruskal W. H., Wallis W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. // *Journal of the American Statistical Association*. 1952. № 260. P. 583-621.
18. M Flores Castañeda et al. Исследование процесса окисления наночастиц висмута с использованием NaClO // *Нанотехнологии*. №20. Т. 34. 2023. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/acb44>
19. McNamee A.P., Tansley G.D., Simmonds M.J. Sublethal mechanical trauma alters the electrochemical properties and increases aggregation of erythrocytes // *Microvascular Research*. 2018. Vol. 120. P. 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.05.008>
20. Megha N. K., Jasmine G. A. Zeta potential as a novel diagnostic tool for pre-eclampsia // *Pregnancy Hypertens*. 2018. Vol. 13. P.187-197. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.06.014>
21. Tsuang Y.H., Sun J.S., Huang Y.C., Lu C.H., Chang W.H., Wang C.C. И Studies of Photokilling of Bacteria Using Titanium Dioxide Nanoparticles // *Artif Organs*. 2008. Vol. 32(2). P. 167-174. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2007.00530.x>
22. Westergren A. Studies on the suspension stability of the blood in pulmonary tuberculosis // *Acta Med. Scand*. 1921. Vol. 54. P. 247-281. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1921.tb15179.x>
23. Yasri S., Wiwanitkit V. Aberration of erythrocyte sedimentation rate by zinc nanoparticles // *Iranian journal of pathology*. 2018. Vol. 13(4). P. 479. <https://doi.org/10.1177/107602960300900310>
24. Zeb A., Liu W., Wu J., Lian J., Lian Y. Knowledge domain and emerging trends in nanoparticles and plants interaction research: A scientometric analysis // *Nano-Impact*. 2021. Vol. 12, 100278. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100278>
25. Z-potential evidences silanol heterogeneity induced by metal contaminants at the quartz surface: implications in membrane damage / Pavan C., Turci F., Tomatis M., Ghiazza M., Lison D., Fubini B. // *Colloids and surfaces b: biointerfaces*. 2017. Vol. 157. P. 449-455. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.012>

References

1. Antsiferova A.A. et al. Vzaimosvyazi mezhdru effektami nanochastits Ag i Ag-soli na povedencheskie i kognitivnye funktsii myshey i starenie [Relationship between the effects of Ag nanoparticles and Ag salts on behavior, on cognitive functions and on aging in mice]. *Otchety po nanobiotekhnologiyam*

- [Reports on nanobiotechnology], 2022, vol. 17, no. 6, pp. 857-865. <https://doi.org/10.1134/S2635167622340018>
2. Bespalov A.V. Poluchenie kompozitsionnykh materialov na osnove nanochastits serebra i vodorastvorimykh polimerov i issledovanie ikh biologicheskoy aktivnosti [Obtaining compositional materials based on silver nanoparticles and water-soluble polymers and examining their biological activity]. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2015, no. 11.3, pp. 1219-1224. <https://doi.org/10.12731/wsd-2015-11.3-1219-1224>
 3. Vovk N.A., Tarkhov M.A., Porokhov N.V. i dr. Gidromekhanicheskoe vozdeystvie na massiv gorizontal'no vyrovnennykh uglerodnykh nanotrubok [Hydro-mechanical influence on a mass of horizontally aligned carbon nanotubes]. *Otchetny po nanobiotekhnologiyam* [Reports on nanobiotechnology], 2022, vol. 17, pp. 774-779. <https://doi.org/10.1134/S2635167622060180>
 4. Okislenie mnogosloynnykh uglerodnykh nanotrubok v parakh perekisi vodoroda: zakonomernosti i efekty [Oxidation of Multilayered Carbon Nanotubes in Hydrogen Peroxide Vapors: Patterns and Effects] / D'yachkova T.P., Khan Yu.A., Orlova N.V., Kondrashov S.V. *Vestnik Tambovskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta* [Tambov University Review], 2016, vol. 22, no. 2, pp. 323-333.
 5. Efimova S. et al. Redkozemel'nye ortovanadatnye nanochastitsy zapuskayut Ca²⁺-zavisimyy eriptoz [Rare-earth orthovanadate nanoparticles trigger Ca²⁺-dependent epiptosis]. *Nanotekhnologii* [Nanotechnologies], 2023, vol. 34, no. 20. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/acbb7f>
 6. Malinovskaya Yu.A., Kovalenko E.I., Kovshova et al. Tsitotoksichnost' i gemosovmestimost' plga nanochastits, nagruzhennykh doksorubitsinom [Cytotoxicity and hemocompatibility of plga nanoparticles loaded with doxorubicin]. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* [Russian biotherapeutic journal], 2020, vol. 19, no. 1, pp. 71-80.
 7. Prisnyy A.A., Moiseeva A.A., Skvortsov V.N. Sravnitel'nyy analiz vliyaniya ftorkhinolonov na leykogrammu krovi tsyplyat [Comparative analysis of the influence of fluorquinolone on the blood leukogram of chicks]. *Siberian Journal of Life Sciences and Agriculture*, 2020, no. 2, pp. 11-24.
 8. Kashuba N.A. O podkhodakh k otsenke vliyaniya nanochastits na organizm cheloveka [On approaches to assessing the influence of nanoparticles on the human body]. *Gigiya i sanitariya* [hygiene and sanitation], 2020, vol. 99, no. 5, pp. 443-447.
 9. Vliyanie razmera i zaryada nestekhiometricheskikh nanochastits sul'fida serebra na ikh vzaimodeystvie s kletkami krovi [Relationship between size and charge of

- non-stoichiometric silver sulfide nanoparticles and their interaction with blood cells]. Rempel' S.V., Aleksandrova N.N., Kuznetsova Yu.V., Gerasimov E.Yu. *Neorganicheskie materialy* [Inorganic materials], 2016, vol. 52, no. 2, p. 131.
10. Sozarukova M.M., Savinova E.A., Proskurnina E.V. Radikal-produtsiruyushchaya aktivnost' neytrofilov krovi v prisutstvii nanochastits dioksida tseriya [Activity of blood neutrophils to produce radicals with the presence of cerium dioxide nanoparticles]. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy* [International Journal of Applied and Basic Research], 2022, no. 12, pp. 37-41.
 11. Toropova Ya.G., Gorshkova M.N., Motorina D.S., Vliyanie nanochastits na osnove oksida zheleza, modifitsirovannykh razlichnymi obolochkami, na generatsiyu aktivnykh form kisloroda stimulirovannymi kletkami krovi cheloveka v usloviyakh in vitro [Influence of nanoparticles based on iron oxide modified by different sheaths on generation of active forms of oxygen by stimulated human blood cells under in vitro conditions]. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii* [Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology], 2021, vol. 57, no. 4, pp. 310-319.
 12. Sharonova N.V., Svirshchevskaya E.V., Popov A.A. et al. Vzaimodeystvie nanochastits sife s epitelial'nymi i limfoidnymi kletkami [Interaction of sife nanoparticles with epithelial and lymphoid cells]. *Bioorganicheskaya khimiya* [Bioorganic chemistry], 2020, vol. 46, no. 6, pp. 736-745.
 13. Fruchtman Y., Perry Z.H., Moser A. Is there still a place to use erythrocyte sedimentation rate in the 21st century. *Harefuah*, 2019, vol. 158(11), pp. 732-736.
 14. Gabriel C Lavorato et al. Redox phase transformations in magnetite nanoparticles: impact on their composition, structure and biomedical applications. *Nanotechnology*, 2023. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/acb943>
 15. Heloise P.F., Carlos L.C., Barjas-Castro M. Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation. *Rev bras hematol hemoter*, 2011, vol. 33(4), pp. 297-301. <https://doi.org/10.5581/1516-8484.20110080>
 16. Karemore M.N., Avari J.G. Zeta potential as a novel diagnostic tool for pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertension*, 2018, vol. 13, pp. 187-197. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.06.014>
 17. Kruskal W. H., Wallis W. A. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 1952, no. 260, pp. 583-621.
 18. M Flores Castañeda et al. Issledovanie protsessa okisleniya nanochastits vismuta s ispol'zovaniem NaClO [Study of the oxidation process of bismuth nanoparticles using NaClO]. *Nanotekhnologii* [Nanotechnologies], 2023, vol. 34, no. 20. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/acb44>

19. McNamee A.P., Tansley G.D., Simmonds M.J. Sublethal mechanical trauma alters the electrochemical properties and increases aggregation of erythrocytes. *Microvascular Research*, 2018, vol. 120, pp. 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2018.05.008>
20. Megha N. K., Jasmine G. A. Zeta potential as a novel diagnostic tool for pre-eclampsia. *Pregnancy hypertension*, 2018, vol. 13, pp. 187-197. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.06.014>
21. Tsuang Y.H., Sun J.S., Huang Y.C., Lu C.H., Chang W.H., Wang C.C. И Studies of Photokilling of Bacteria Using Titanium Dioxide Nanoparticles. *Artif Organs.*, 2008. Vol. 32(2). P. 167-174. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2007.00530.x>
22. Westergren A. Studies on the suspension stability of the blood in pulmonary tuberculosis. *Acta Med. Scand*, 1921, vol. 54, pp. 247–281. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1921.tb15179.x>
23. Yasri S., Wiwanitkit V. Aberration of erythrocyte sedimentation rate by zinc nanoparticles. *Iranian journal of pathology*, 2018, no. 13(4), pp. 479. <https://doi.org/10.1177/107602960300900310>
24. Zeb A., Liu W., Wu J., Lian J., Lian Y. Knowledge domain and emerging trends in nanoparticles and plants interaction research: A scientometric analysis. *NanoImpact*, 2021, vol. 12, 100278. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100278>
25. Z-potential evidences silanol heterogeneity induced by metal contaminants at the quartz surface: implications in membrane damage / Pavan C., Turci F., Tomatis M., Ghiazza M., Lison D., Fubini B. *Colloids and surfaces b: biointerfaces*, 2017, vol. 157, pp. 449-455. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.012>

ВКЛАД АВТОРОВ

Невзорова Е.В.: разработка концепции научной работы, сбор и анализ данных, составление черновика рукописи, написание рукописи.

Немцова В.В.: разработка концепции научной работы, редактирование черновика рукописи, написание рукописи.

Беляев А.А.: редактирование черновика рукописи.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Elena V. Nevzorova: development of the concept of scientific work, data collection and analysis, drafting of the manuscript, manuscript writing.

Viktoriya V. Nemtsova: development of the concept of the scientific work, editing of the draft manuscript, writing the manuscript.

Anton A. Belyaev: editing of draft manuscript.

ДАнные ОБ АВТОРАХ

Невзорова Елена Владимировна, профессор кафедры медицинской биологии Медицинского института, доктор биологических наук, доцент
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина»
ул. Интернациональная, 33, г. Тамбов, 392000, Российская Федерация
evnevzorova@yandex.ru

Немцова Виктория Викторовна, старший преподаватель кафедры медицинской биологии Медицинского института
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина»
ул. Интернациональная, 33, г. Тамбов, 392000, Российская Федерация
Vi.nemtsova@yandex.ru

Беляев Антон Александрович, старший преподаватель кафедры медицинской биологии Медицинского института
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина»
ул. Интернациональная, 33, г. Тамбов, 392000, Российская Федерация
aragon_rw@mail.ru

DATA ABOUT THE AUTHORS

Elena V. Nevzorova, BD, Professor, associate professor of the Medical Biology Chair of Medical Institute
Tambov State University named after G.R. Derzhavin
33, Internatsional'naya Str., Tambov, 392036, Russian Federation
evnevzorova@yandex.ru
SPIN-code: 2067-6425
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3229-0738>

Viktoriya V. Nemtsova, Senior professor of the Medical Biology Chair of Medical Institute
Tambov State University named after G.R. Derzhavin
33, Internatsional'naya Str., Tambov, 392036, Russian Federation

Vi.nemtsova@yandex.ru

SPIN-code: 3059-0085

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9081-7289>

Anton A. Belyaev, Senior professor of the Medical Biology Chair of Medical Institute

Tambov State University named after G.R. Derzhavin

33, Internatsional'naya Str., Tambov, 392036, Russian Federation

aragon_rw@mail.ru

SPIN-code: 8049-8808

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1936-044X>

Поступила 24.08.2023

После рецензирования 05.09.2023

Принята 07.10.2023

Received 24.08.2023

Revised 05.09.2023

Accepted 07.10.2023