

Є.М. Мамотюк,
С.В. Руденко,
В.А. Гусакова,
І.О. Леонова,
О.В. Ненюкова,
О.Л. Масленнікова

До питання про механізм радіопротекторної дії наноалмазів

ДУ Інститут медичної
радіології ім. С.П. Григор'єва
АМН України, Харків

On mechanisms of radioprotective effect of nanodiamonds

Цель работы: Определить в опытах in vitro наличие процесса взаимодействия между эритроцитами и наноалмазами (НА) и установить возможные последствия такого контакта.

Материалы и методы: В модельных экспериментах на отмытых эритроцитах крови доноров анализировали спектрофотометрически (СФ-26) гемолизирующее действие разных концентраций НА детонационного синтеза ультрадисперсных алмазов (УДА), влияние на показатели формы эритроцитов (индекс формы) и процессы их агрегации путем использования фотометра-агрегометра ФА-01 и проводили микроскопирование эффектов взаимодействия НА и красных клеток крови (микроскоп Axilab с цифровым фотоаппаратом).

Результаты: Показано, что в пределах концентрации НА (0,01–0,04) % не наблюдается гемолитического действия на эритроциты крови доноров. Добавление НА к взвеси отмытых эритроцитов вызывает изменение их дискоидной формы в сторону сферичности и ведет к образованию агрегатов, тесно связанных с конгломератами наноалмазов. Последнее может быть характерным для мембран различных клеток и обуславливает радиозащиту эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта, наблюдаемую в предыдущей работе.

Выводы: Наноалмазы детонационного синтеза являются биологически активной субстанцией, способной при контакте с клетками изменять их свойства. На модели взаимодействия с эритроцитами показано выраженное формотрансформирующее влияние на клетки, не ведущее к гемолизу, и активирование агрегационных процессов. Механизм эффектов связан с контактным взаимодействием и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: наноалмазы, взаимодействие с эритроцитами, гемолиз, изменение формы, агрегация.

Мета роботи: Визначити в дослідах in vitro наявність процесу взаємодії між еритроцитами і наноалмазами (НА) і з'ясувати можливі наслідки такого контакту.

Матеріали і методи: В модельних експериментах на відмитих еритроцитах крові донорів спектрофотометрично (СФ-26) аналізували гемолізуючу дію різних концентрацій НА детонаційного синтезу ультрадисперсних алмазів (УДА), вплив на показники форми еритроцитів (індекс форми) і процеси їх агрегації шляхом використання фотометра-агрегометра ФА-01, а також мікроскопували ефекти взаємодії НА і червоних клітин крові (мікроскоп Axilab з цифровим фотоапаратом).

Результати: Показано, що в межах концентрації НА (0,01–0,04) % не спостерігається гемолітичної дії на еритроцити крові донорів. Додавання НА у суспензію відмитих еритроцитів спричиняє зміни їх дискоїдної форми в бік сферичності й веде до утворення агрегатів, тісно пов'язаних з конгломератами наноалмазів. Останнє може бути характерним для мембран різних клітин і спричинювати радіозахист епітеліальних клітин шлунково-кишкового тракту, що спостерігалось в попередній роботі.

Висновки: Наноалмази детонаційного синтезу є біологічно активною субстанцією, здатною при контакті з клітинами змінювати їх властивості. На моделі взаємодії з еритроцитами показано виражений формотрансформуючий вплив на клітини, що не веде до гемолізу, й активування агрегаційних процесів. Механізм ефектів пов'язаний з контактною взаємодією і потребує подальшого вивчення.

Ключові слова: наноалмази, взаємодія з еритроцитами, гемолиз, зміна форми, агрегація.

У попередній роботі [1] на щурах було показано радіозахисну дію ультрадисперсних алмазів (УДА), які вводяться per os за 16 і за 1 годину до рентгенівського опромінювання. Ефект передусім пов'язаний з меншим ушкодженням шлунково-кишкового тракту (ШКТ) тварин за

Objective: To determine in vitro the presence of the process of interaction between erythrocytes and nanodiamonds (ND) and establish possible consequences of this contact.

Material and Methods: Hemolyzing effect of different concentrations of ND of detonation synthesis (UDD), the influence on the parameters of erythrocyte shape (shape index) and processes of aggregation were analyzed spectrophotometrically (SF-26) by means of application of a photometer-aggregometer FA-01 in the experiment on washed donor blood erythrocytes. Microscopy of the effects of interaction of ND and red blood cells was done (Axilab microscope with a digital camera).

Results: It was shown that hemolytic effect of the donor blood erythrocytes was not observed within the concentration of ND (0.01–0.04) %. Addition of ND to the suspension of washed erythrocytes changed their discoid shape to spherical one and resulted in formation of aggregates joined with conglomerates of nanodiamonds. The latter can be characteristic for the membranes of different cells and promote radiation protection of epithelial cells of the gastrointestinal tract, which was observed in the previous work.

Conclusion: Nanodiamonds of detonation synthesis are biologically active substance capable of changing the qualities of cells on contact with them. Pronounced phototransforming influence on the cells which does not result in hemolysis. activation of aggregation processes was shown on the model with erythrocytes. The mechanism of the effects is associated with contact interaction and requires further investigation.

Key words: nanodiamonds, interaction with erythrocytes, hemolysis, changes of the shape, aggregation.

рахунок можливої контактної взаємодії наноалмазів (НА) з мембранами клітин епітелію ШКТ, про що свідчать високі адсорбційні властивості НА [2]. У роботі [3] описані подібні явища, виявлені авторами: при контакті з НА ретикулоцити крові людини адсорбують на своїх

клітинних мембранах вуглецеві частинки, внаслідок чого вірогідно змінюється метаболізм клітин. Для перевірки припущення про контактний механізм взаємодії НА з мембранами клітин і можливу універсальність цього явища нами були обрані еритроцити, часто використовували як модель для розв'язання аналогічних задач. Отже метою роботи стало визначення в дослідках *in vitro* наявності процесу взаємодії між еритроцитами і НА та з'ясування можливих наслідків такого контакту. Оскільки в літературі [4] опубліковано дані про лізуючий вплив зразків УДА на білі й червоні клітини крові, вивчали дію НА на гемоліз еритроцитів та морфологію й агрегацію цих клітин [5].

Методика дослідження

У роботі застосовували водно-сольові суспензії ультрадисперсних алмазів детонаційного синтезу, які поставлялися ТОВ НПП SINTA (Харків) після глибокого хемічного очищення і додаткової гідромеханічної обробки з використанням ефектів гідродинамічної кавітації. Розміри первинних кристалів становили 3–5 нм. Середній розмір агрегатів свіжоотриманих суспензій НА відповідав 25–200 нм при рН 6,5–7,5.

Використовували кров 9 донорів (жінки віком 35–45 років), отриману за згодою пацієнток шляхом стерильної венопункції в 5 мл вакуумні пробірки з напилюванням двокалієвої солі ЕДТА фірми TERUMO (Японія). Одержані зразки крові витримували при кімнатній температурі 1,0–1,5 години. З відшарованої еритроцитарної маси відбирали 0,15–0,20 мл і розводили в 5 мл незабуференого фізіологічного розчину (150 ммоль NaCl), центрифугували протягом 2 хв при 3000 об/хв і акуратно відбирали надосадову рідину. Відмивання робили двічі. При цьому другий раз перед центрифугуванням додавали ізотонічний розчин (150 ммоль NaCl, 5 ммоль NEPES, рН 7,4). Після центрифугування надосадову рідину з проби відбирали до залишкового об'єму в 1 мл і використовували як стік-суспензію. Перед вимірюванням її обережно розмішували вручну.

Для дослідження змін форми еритроцитів зі стік-суспензії відбирали 0,007–0,010 мл і додавали до 2 мл фізіологічного розчину до оптичної густини (ОГ), яка дорівнювала 0,300 за фотометром-агрегометром, описаним нижче. Ця густина відповідно до каліброваної кривої дорівнювала $6,0 \times 10^6$ клітин у 1 мл досліджуваної суміші.

Для оцінки гемолітичної дії суспензій НА на еритроцити крові людей стік-суспензію розводили фізіологічним розчином до вмісту $1,6 \times 10^4$ еритроцитів у 1 мл, додавали суспензію НА в кінцевій концентрації (0,01–0,04) % за масою і витримували впродовж 90 хв при кімнатній температурі (близько 20 °С) або 24 години (при + 4 °С). Після цього проби центрифугували при 7000 об/хв протягом 10 хв і вимірювали оптичну густину у кюветі 1 см при 410–415 нм (пік поглинання гемоглобіну) на спектрофотометрі СФ-26 (ЛОМО). За контроль брали проби, піддані таким самим процедурам, але без внесення суспензії НА. Позитивний контроль складався з проб еритроцитів, у яких було проведено повний осмотичний гемоліз шляхом додавання води.

Для вивчення змін форми еритроцитів і їх можливої агрегації під дією водних суспензій НА використовували розроблений і виготовлений за участю одного з авторів

статті двокалієвий фотометр-агрегометр ФА-01 [5], калібрований за концентраційним фотоколориметром КФК-2. Агрегометр поряд із оптичною густиною вимірює і флуктуації інтенсивності світлового потоку в червоному діапазоні (920 нм), що несуть інформацію про форму окремих клітин або їх агрегатів [6]. Використовували величину показника «індекс форми» (ІФ), розраховану за формулою

$$ІФ = k \times D,$$

де k — постійний коефіцієнт, який залежить від коефіцієнта підсилення сигналу і від калібрування приладу; D — середньоквадратична величина амплітуди флуктуацій світлового потоку.

Калібрувальний коефіцієнт k дозволяє сформувати шкалу вимірювань ІФ, що відбиває ступінь дисконформності еритроцитів. Для дисків ця величина дорівнює 1, а для сфер — 0,07. Клітинну суспензію перемішували за допомогою магнітної мішалки з частотою 600 об/хв. Морфологічні докази, що ІФ безпосередньо пов'язаний з формою клітин, можна знайти в [5].

У циліндричну скляну чи пластикову прозору кювету діаметром 10 мм вміщували 2 мл фізрозчину, 10–12 мкл стік-суспензії еритроцитів. Клітини інкубували 50 с у фізіологічному розчині, після чого в кювету додавали 20 мкл розчину НА і реєстрували процес зміни форми та агрегації еритроцитів упродовж 10 хв.

При дослідженні процесів морфологічної трансформації й агрегації еритроцитів, індукованих УДА, використовували два режими роботи приладу ФА-01. У першому, основному, режимі прилад дозволяє виміряти величину показника ІФф (індекс форми при трансформації клітин), який характеризує форму еритроцитів і ступінь її відхилення від вихідної дисконформної форми (ІФ₀). Чим більше дана форма клітин після впливів відрізняється від повністю дисконформної, при якій ІФ₀ дорівнює одиниці, тим менше реєстрований індекс форми (величина ІФф). У другому, допоміжному, режимі прилад дозволяє розраховувати величину показника ІФа (індекс форми агрегатів), який у цьому випадку хоча й обчислюється аналогічно ІФф, але має інший фізичний зміст, а саме, його величина характеризує ступінь агрегації клітин, що відбувається у системі. Чим більше величина ІФа, тим більший «ступінь агрегації», тобто розмір агрегатів. У даному випадку ІФа є інтегральним показником величини, кількості і форми агрегатів еритроцитів, утворених у кюветі.

Процес взаємодії відмитих еритроцитів з НА досліджували також мікроскопічно за допомогою мікроскопа Axilab (Carl Zeiss, Німеччина) з наступним фотодокументуванням зображень при оптичному збільшенні 40–1000 (цифрова камера Canon-700 А, Японія).

Для приблизних вимірювань розмірів структур користувалися об'єктомікрометром ОМП із комплексу приналежностей до мікроскопа МБІ-6.

Кількісні показники опрацьовували статистично за Стьюдентом з використанням програми Statistica для Windows v.5.0.

Результати та їх обговорення

При дослідженні можливої лізуючої дії часток НА, які перебувають у водно-сольовому середовищі разом з еритроцитами, використовували кров «ex tempore». Результати визначення ОГ надосадової рідини після взаємодії протягом 90 хв і 24 годин НА з відмитими еритроцитами представлені в табл. 1.

Для порівняння і доведення працездатності методу в еритроцитах від 9 донорів проведено

повний водний осмотичний гемоліз в аналогічних з дослідом умовах. Оптична середня густина при цьому становила $(1,42 \pm 0,04)$ одиниць, що підтверджує адекватність методу.

Як впливає з табл. 1, додавання суспензій НА до суспензії еритроцитів здорових людей не викликає вірогідного приросту величини показника ОГ ні при 90-хвилинному, ані при 24-годинному впливі. Вихідна залишкова ОГ у пробах пов'язана з неповним видаленням частини клітин і невеликим спонтанним гемолізом. Таким чином, можна вважати, що в межах узятих концентрацій НА $(0,01-0,04)$ % вони не викликають гемолізу свіжовідмитих еритроцитів донорів. Остання обставина дозволила об'єднати результати досліджень у загальні групи. Це твердження не поширюється на еритроцити хворих людей, оскільки в деяких випадках при 24-годинному витримуванні в них виявлено процес спонтанного гемолізу, на швидкість якого високі концентрації НА впливали без чіткої закономірності.

Відомості деяких авторів про лізуючу дію УДА на клітини крові, ймовірно, отримані при

вивченні недостатньо очищених зразків НА, що враховано при їх виробництві у даних дослідженнях.

Дослідження взаємодії НА з еритроцитами, виконане за допомогою вимірювань величин показників зміни форми клітин і наявності процесу їх агрегації на приладі ФА-01, показало, що додавання до суспензії еритроцитів суспензії вуглецевих частинок приводить до істотної зміни форми еритроцитів і вираженого процесу агрегації клітин. Досліди проведено на 7 донорах у 2–5 повторюваностях. Табл. 2 ілюструє дане положення.

Наведені дані свідчать про те, що додані до еритроцитів наноалмази викликають істотну зміну рівнів показників форми клітин, яка супроводжується розвитком агрегаційних ефектів між клітинами. Останні можуть вносити похибку у визначення форми окремих клітин, оскільки на результат накладатиметься інформація про форму утворюваних агрегатів. У зв'язку з цим після додавання НА в суспензію перемішуваних клітин мішалку виключали й суспензію інкубували протягом 8 хв, дозволяю-

Таблиця 1

Визначення гемолітичної дії УДА на еритроцити крові
Determining hemolytic action of UDD on blood erythrocytes

Показник	Одиниці екстинкції, оптична густина			
	без НА		з НА	
Час витримки	90хв	24 г	90хв	24 г
Номер групи	1	2	3	4
n — кількість проб	20	27	35	20
\bar{X} — середнє арифметичне	0,062	0,054	0,054	0,056
$S\bar{x}$ — похибка середнього	0,006	0,006	0,008	0,007
p	—	—	0,513	0,877

Примітка. p — вірогідність розбіжностей між групами 1–3, 2–4.

Таблиця 2

Зміна величини індекса форми відмитих еритроцитів крові людини у присутності НА
Changes of shape index of washed human blood erythrocytes at presence of ND

Індекс	Значення індексу форми		
	n	$\bar{X} \pm S\bar{x}$	p
1.ІФ ₀ — вихідний	7	0,922 + 0,036	—
2.ІФа — форми агрегатів	6	1,026 + 0,129	0,421
3.ІФф — форми клітин	7	0,360 + 0,060	0,000

Примітка. p — вірогідність розбіжностей при порівнянні з величиною показника ІФ₀.

чи, таким чином, наноалмазам взаємодіяти з еритроцитами, але запобігаючи агрегації клітин, оскільки без перемішування вони не зіштовхуються і не агрегують. Після цього перемішування вмикали і відразу ж визначали величину показника ІФф, представлена в табл. 2, що характеризує форму, яку еритроцити набули після взаємодії з НА. Як можна побачити з табл. 2, величина ІФф після взаємодії значно ($36,0 \pm 6,5$) % і вірогідно нижча від вихідної величини ІФ_о, що свідчить про те, що еритроцити змінили свою форму з дискоїдної у бік більш сферично симетричних форм (ехіноцитів або стоматоцитів). Це переконливо доводить, що взаємодія НА з еритроцитами призводить до зміни форми клітин.

Досить несподіваним виявився факт, раніше не відзначений у літературі, що вказує на здатність УДА викликати агрегацію еритроцитів. З табл. 2 випливає, що величина показника ІФа дещо більше, але не вірогідно, відрізняється від вихідного й величини показника в пробах без НА (ІФ_о), що має значення, близьке до одиниці. З огляду на візуально спостережувану в цей момент агрегацію, що відбувається, значення ІФа характеризує агрегатний стан суспензії еритроцитів у другому режимі роботи приладу, як підкреслювалося вище (див. розд. «Методика дослідження»).

Процес взаємодії ізольованих еритроцитів вивчали також за допомогою світлової мікроскопії. З цією метою зразки стік-суспензії еритроцитів клітин змішували (1 : 1) із суспензією наноалмазів (кінцева концентрація 0,05 %) зі збереженням іонної сили, витримували при періодичному перемішуванні протягом 1,5 години при кімнатній температурі й частину із суміші вміщували на предметне скло, обережно покривали покривним і мікроскопіювали при різному збільшенні. На рис. 1–3 представлені окремі типові результати спостережень.

Так, рис. 1 ілюструє розташування еритроцитів у стік-суспензії без НА. Клітини рівномірно розташовані в полі зору, і навіть при вищій їх концентрації практично не з'єднуються в агрегати. На рис. 2 зображений один з конгломератів еритроцитарних клітин, що утворився при 1,5-годинному перебуванні в присутності НА. Подібні утворення, безліч яких містить

суспензія, складаються з кількох десятків клітин, прилеглих одна до однієї з різним ступенем щільності, і непостійного складу, що, певно, є ре-

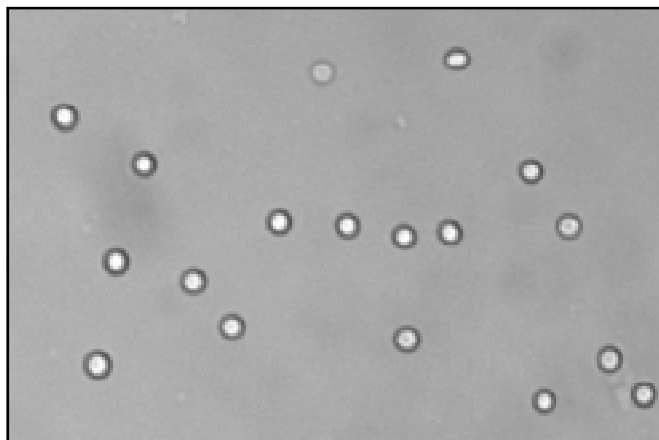


Рис. 1. Еритроцити без наноалмазів. Оптичне збільшення, $\times 200$

Fig. 1. Erythrocytes without nanodiamonds. Optic magnification, $\times 200$

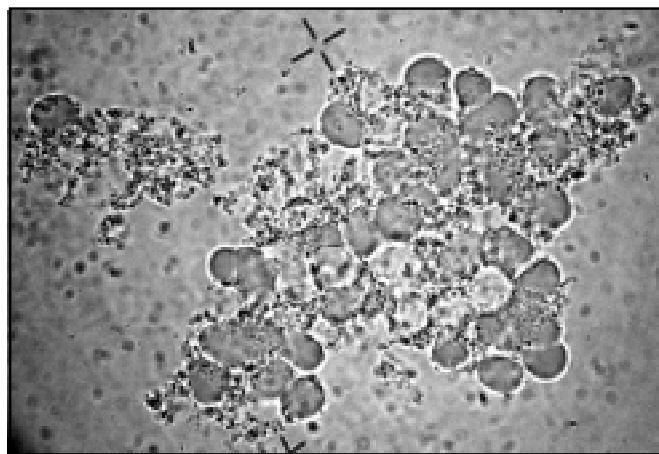


Рис. 2. Наноалмази та еритроцити, інкубація 1,5 години. Оптичне збільшення, $\times 400$

Fig. 2. Nanodiamonds and erythrocytes, 1.5-hour incubation. Optic magnification, $\times 400$

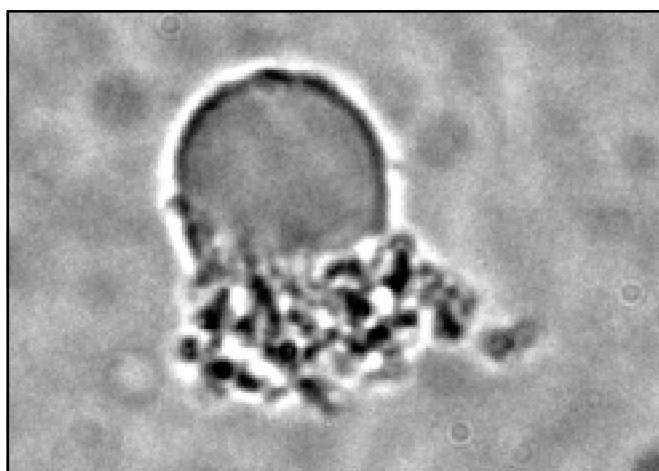


Рис. 3. Окремий еритроцит з наноалмазами. Оптичне збільшення, $\times 1000$

Fig. 3. A separate erythrocyte with nanodiamonds. Optic magnification, $\times 1000$

зультатом індукованої агрегації. Причиною цього можуть бути процеси, викликані присутністю НА поблизу поверхні мембран клітин. Так, на рис. 2 досить чітко видно круглясті дрібніші утворення розміром 300–700 нм, а також поєднані в комплекси розсипи, які тісно примикають до поверхні еритроцитів. Вони покривають клітини або з усіх боків, або з одного боку (рис. 3).

Зазначені утворення, видимі мікроскопічно, за даними літератури [7], є наслідком властивого для НА процесу мікроагрегації через високу поверхневу активність вуглецевих частинок нанодіапазону. В результаті збереження суспензій водних НА частинки поєднуються у складні структури — кластери, які досягають розмірів видимості у світловому мікроскопі. Ймовірно, дрібніші частинки НА з більшою поверхневою активністю можуть взаємодіяти безпосередньо з навколосмембранним простором і мембранами, але оптично не виявляються.

Нині важко відповісти на питання, яка природа цієї взаємодії, чи контактують частинки наноалмазів безпосередньо з мембраною клітин (контактна взаємодія) або ж впливають через водну фазу в безпосередній близькості від мембрани, наприклад, за рахунок електростатичної взаємодії і зміни електричного потенціалу мембрани. Це питання вимагає окремого, детальнішого дослідження. До механізмів впливу на разові клітини, що контактують із НА, варто віднести ймовірний піноцитоз (якщо клітина має таку здатність), вплив на мембрани структурованої води, утворення якої властиві НА [2]. Особливо важливою є можлива участь НА у вільнорадикальних реакціях поблизу мембран клітин. Останнє характерне для НА, які, за даними літератури, можуть виявитися пасткою вільних електронів [2]. Наявність зазначеного механізму могла б пояснити феномен захисту клітин епітелію ШКТ опромінених тварин, яких ми спостерігали [1]. Однак факти, отримані в даній роботі, переконливо свідчать на користь того, що наноалмази є активним компонентом середовища, яке впливає у даному випадку на еритроцити і змінює їх біологічні характеристики. Очевидно, подібна взаємодія може відбуватися й з іншими типами клітин і опосередковувати зміну їх біологічних властивостей.

Окремо слід зупинитися на виявленому факті агрегації еритроцитів при контакті з НА. Наявність такого процесу є перешкодою для введення НА безпосередньо у кров і потребує подальших досліджень і відповідних технологічних доробок.

Висновки

1. Наноалмазам при контакті з відмитими еритроцитами крові донорів у концентрації (0,01–0,04) % не властива гемолітична дія при зберіганні суспензій протягом 1,5 і 24,0 години.
2. Додавання до суспензій еритроцитів наноалмазів (0,01 %) змінює їх дискоїдну форму, наближаючи її до сферичної.
3. Наноалмази (0,01 % і вище) викликають агрегацію еритроцитів при перемішуванні сумішей.

Література

1. Мамотюк Є.М., Гусакова В.А., Узленкова Н.Є. та ін. // УРЖ. — 2009. — Т. XVII, вип. 1. — С. 65–71.
2. Долматов В.Ю. // Успехи химии. — 2001. — Т. 70, № 7. — С. 687–708.
3. Safronova V.G. // 3rd Internat. Sumpos. Detonat. Nanodiamonds: Technol., Propert. and Applicat. "Nano Diamond' 2008", StPeterburg, Russia, July 01–04, 2008. — StPeterburg, 2008. — P. 19–20.
4. Пузырь А.П., Нешумаев Д.А. // Биофиз. — 2005. — Т. 50, № 1. — С. 101–106.
5. Руденко С.В., Кроув Дж.Х., Таблин Д. // Биохим. — 1998. — Т. 63, вып. 1. — С. 1630–1639.
6. Руденко С.В. // Биол. мембраны. — 2006. — Т. 22, № 5. — С. 396–404.
7. Osawa E. // Jap. Nanonet. Bullet. — 2007. — № 91. — P. 26–29.

Надходження до редакції 29.05.2009.

Прийнято 13.07.2009.

Адреса для листування:

Мамотюк Євгеній Михайлович,
ДУ Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва АМНУ,
вул. Пушкінська, 82, Харків, 61024, Україна