

эритроцитов. Квантовая электроника, 2010, том 40, N 12, с. 1074 – 1076.

2. Никитин С.Ю., Луговцов А.Е., Приезжев А.В., Устинов В.Д. Связь видности дифракционной картины с дисперсией размеров частиц в эктацитометре. Квантовая электроника, 2011, т. 41, N 9, с. 843-846.

3. Никитин С.Ю., Устинов В.Д., Шишкин С.Д., Лебедева М.С. Алгоритм кривизны линии в лазерной эктацитометрии эритроцитов. Квантовая электроника, 2020, т. 50, N 9, стр. 888 - 894.

4. Лебедева М.С., Цыбров Е.Г., Никандрова А.Е. Эксперименты по лазерной дифрактометрии мазков крови. Оптические методы исследования потоков: Труды XVI Международной научно-технической конференции, 28 июня - 02 июля 2021, Москва, «Перо», с. 175 – 182.

УДК 535.8; 577.352.336; 577.325.3; 539.2

Луговцов А.Е., Тучин В.В., Переведенцева Е.В., Ч.-Л. Ченг, Приезжев А.В.

МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЭРИТРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА И ИХ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ ИНКУБАЦИИ КРОВИ С НАНОЧАСТИЦАМИ Fe_2O_3 ПЕРСПЕКТИВНЫМИ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

Аннотация. При целенаправленном введении в кровотоки пациента наночастиц оксида железа Fe_2O_3 для целей диагностики и терапии заболеваний может возникать взаимодействие наночастиц с эритроцитами, что может приводить к изменениям как микро-реологических свойств отдельных клеток. Методами лазерной дифрактометрии и агрегометрии проведены исследования на пробах крови человека по влиянию наночастиц железа Fe_2O_3 без и с порфирином на поверхности в концентрациях от 0 до 1000 мкг/мл на деформационные и агрегационные параметры эритроцитов. Концентрации до 100 мкг/мл не оказывают влияние на деформируемость эритроцитов, а добавление НЧ в кровь замедляет агрегацию эритроцитов. С использованием флуоресцентной

© Луговцов А.Е., Тучин В.В., Переведенцева Е.В., Ч.-Л. Ченг, Приезжев А.В., 2022

микроскопии показано, что присутствие наночастиц в образцах крови приводит к их адсорбции на поверхности мембраны эритроцитов.

Ключевые слова: агрегация и деформируемость эритроцитов, лазерная агрегометрия и дифрактометрия, наночастицы оксида железа.

Lugovtsov A.E., Tuchin V.V., Perevedentseva E.V., Cheng C.-L., Priezzhev A.V.

MICROREOLOGICAL PARAMETERS OF HUMAN ERYTHROCYTES AND THEIR CHANGES UNDER BLOOD INCUBATION WITH Fe₂O₃ NANOPARTICLES PROMISING FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Abstract. With the targeted administration of Fe₂O₃ iron oxide nanoparticles into the bloodstream for a diagnostic and treatment reasons, the interaction of nanoparticles with red blood cells may occur, which can lead to changes the microrheological properties of individual cells. The laser diffractometry and aggregometry techniques were used to study the effect of Fe₂O₃ iron oxide nanoparticles without and with porphyrin surface functionalization at concentrations from 0 to 1000 µg/ml on the deformation and aggregation parameters of red blood cells in human blood samples. Concentrations up to 100 µg/ml do not affect the deformability of erythrocytes, and the addition of NPs to the blood decrease red cells aggregation. Fluorescence microscopy technique demonstrate that the presence of nanoparticles in blood samples leads to their adsorption on the membrane surface.

Key words: aggregation and deformability of erythrocytes, laser aggregometry and diffractometry, iron oxide nanoparticles.

ВВЕДЕНИЕ

При целенаправленном введении в кровоток пациента наночастиц (НЧ) оксида железа Fe₂O₃ для целей диагностики и терапии заболеваний может возникать взаимодействие НЧ с белками плазмы крови, мембранами эритроцитов а также внутреннем содержимым эритроцитов. Это взаимодействие может приводить к изменениям как микро-реологических свойств отдельных клеток, так и реологии крови в отдельно взятом образце (*in vitro*), а также непосредственно в живом организме (*in vivo*). Изменение реологии крови на микро- и на макроуровнях часто являются причиной и

следствием многочисленных сосудистых заболеваний и даже причиной смертности. Положительный эффект от использования НЧ должен превышать возможный вред, который может быть нанесен пациенту при использовании НЧ. Поэтому всестороннее и комплексное исследование безопасности НЧ оксида железа должно предшествовать их применению в медицинских целях.

В этой связи, данная работа была направлена на исследование влияния НЧ оксида железа Fe_2O_3 на реологию крови. Данный тип частиц считается перспективным для использования при фотодинамической терапии опухолей [1]. Покрытие частиц порфирином и его производными может увеличить качество терапии онкологических заболеваний, так как порфирин обладает высоким сродством к раковым клеткам, а также избирательно фотосенсибилизирует их. Благодаря этому локальное воздействие лазерного излучения приводит к редукции опухолевой ткани [2, 3].

Основной целью работы было проведение серии экспериментов по изучению *in vitro* влияния частиц Fe_2O_3 без и с функционализацией поверхности порфирином в различных концентрациях на микрореологические свойства цельной крови и эритроцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все измерения на образцах цельной крови человека, их инкубация с НЧ в различных концентрациях, измерения на суспензии эритроцитов были выполнены *in vitro*. Измерения микрореологических параметров эритроцитов проводились методами лазерного диффузного рассеяния света (лазерная агрегометрия) и лазерной дифрактометрии. Для этих целей использовался лазерный деформометр-агрегометр эритроцитов Реоскан (RheoScan-AnD300) компании Реомедитех (Республика Корея) [4-5].

Метод лазерной дифрактометрии основан на регистрации дифракционных картин от тонкого слоя сильноразбавленной суспензии эритроцитов присутствии сдвигового потока. По изменению формы дифракционной картины можно судить о способности клеток деформироваться. Данная методика позволяет получить зависимость индекса деформируемости DI (эксцентриситет эллипса линии изоинтенсивности - уровня одинаковой интенсивности – на дифракционной картине) от сдвигового напряжения потока. Чем больше индекс деформируемости, тем способность клеток крови изменять свою форму больше.

Метод лазерной агрегометрии основан на регистрации кинетики диффузного рассеяния света от слоя цельной крови. По полученной кинетике – зависимости от времени интенсивности света рассеянного вперед от слоя цельной крови – можно определять критическое сдвиговое напряжение (critical shear stress - CSS), характеризующие прочность эритроцитарных агрегатов, а также характерное время агрегации эритроцитов ($T_{1/2}$) и индекс их агрегации (AI), характеризующий относительное число эритроцитов проагрегировавших в первые 10 сек процесса спонтанной агрегации. Чем выше значение AI и ниже $T_{1/2}$, тем агрегация эритроцитов в образце цельной крови больше.

Для изучения взаимодействия между НЧ и эритроцитами, а именно для изучения сорбции на мембране и внутриклеточного проникновения, были проведены эксперименты с использованием метода флуоресцентной лазерной конфокальной микроскопии. Для этого была использована система Nikon A1R (Япония), и флуоресцентный сигнал был обнаружен как от порфирин-функционализированных частиц, так и от эндогенных флуорофоров эритроцитов.

Все измерения микрореологических параметров эритроцитов, их инкубация с НЧ проводились в течение первых 2-х часов после забора крови у добровольцев. Все пробы крови были стабилизированы антикоагулянтом ЭДТА, что позволило избежать свертываемости крови во время эксперимента. Инкубация и измерения проводились при температуре 37°C, что соответствует физиологическим условиям в организме человека. Доноры крови были в полной мере информированы об исследованиях и понимали цель исследований, ожидаемые результаты. Все добровольцы подписали добровольное согласие на взятие у них крови и проведение испытаний.

Известно, что НЧ легко образуют агрегаты с размерами в несколько раз больше их собственного. В этой связи, сразу перед инкубацией НЧ с эритроцитов мы разбивали суспензию НЧ в буферном растворе с помощью лабораторного шейкера в течении 3 мин, а затем с помощью УЗ-ванны Codyson CD-4820 мощностью 70 Вт на протяжении 5 мин. Эти манипуляции помогали нам избавиться от агрегатов частиц в исследуемых образцах.

Всего было выделено 7 экспериментальных групп крови: цельная кровь (контрольная группа), кровь инкубированная с не

покрытыми порфирином НЧ Fe_2O_3 в концентрациях 33, 100 и 100 мкг/мл, кровь инкубированная с покрытыми порфирином НЧ Fe_2O_3 в концентрациях 33, 100 и 100 мкг/мл. В каждой экспериментальной группе было исследовано по 10 образцов крови. Экспериментальные данные были статистически обработаны с использованием программного обеспечения Statistica. Для анализа использовался непараметрический статистический Т-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В экспериментах, проведенных методом лазерной дифрактометрии, было показано, что 45 минутная инкубация эритроцитов с покрытыми и непокрытыми порфирином НЧ Fe_2O_3 приводит к не большим (статистически не значимым $p > 0,05$) изменениям в деформируемости эритроцитов (зависимости индекса деформируемости от напряжения сдвига). Данные зависимости приведены на рисунке 1.

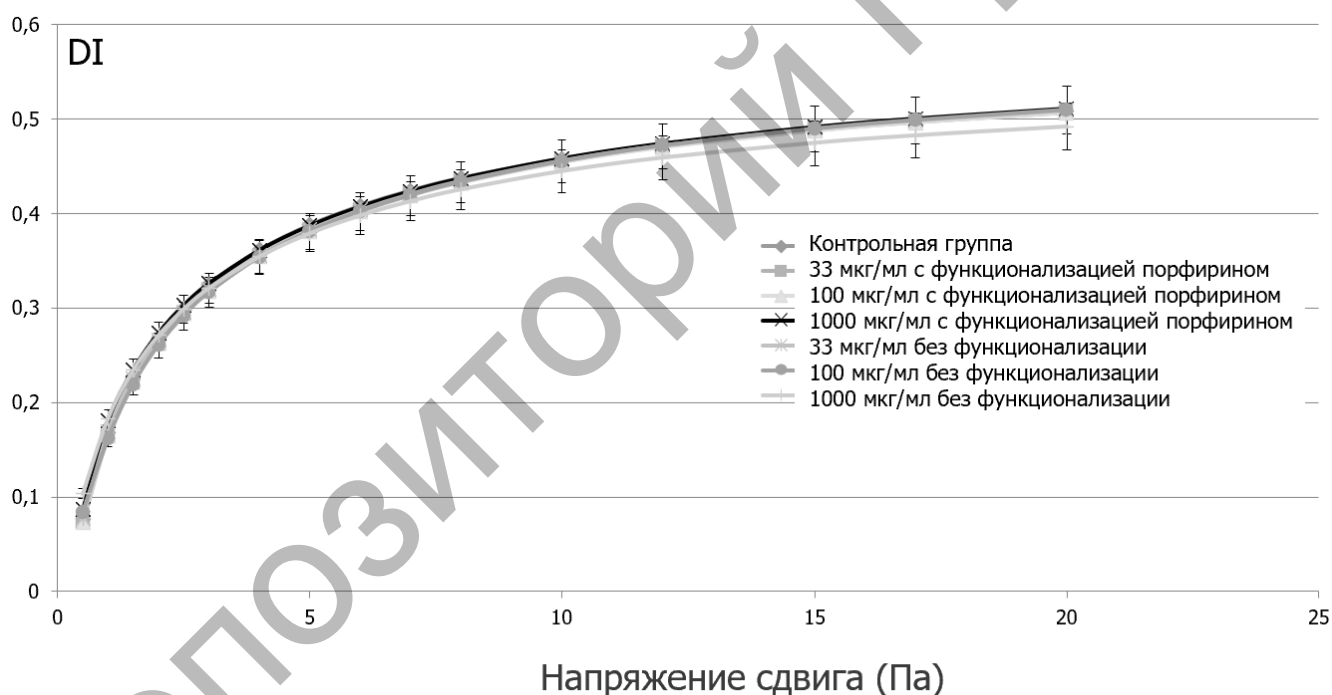


Рис. 1. Зависимость индекса деформируемости эритроцитов от сдвигового напряжения без и после 45 минутной инкубации крови с частицами Fe_2O_3 в различной концентрации. Изменения достоверно не значимо отличаются ($p > 0.05$) от контроля.

В экспериментах, проведенных методом лазерной агрегометрии, было показано, что 45 минутная инкубация эритроцитов с покрытыми и непокрытыми порфирином НЧ Fe_2O_3 приводит к значительным статистически значимым изменениям агрегационной

кинетики ($p < 0,05$). Способность эритроцитов агрегировать ухудшалась с возрастанием концентрации НЧ оксида железа (покрытых и непокрытых порфирином). Так было показано, что характерное время образования агрегатов эритроцитов $T_{1/2}$ возрастает на $13 \pm 4\%$, $80 \pm 11\%$ and $115 \pm 19\%$ при концентрациях 33 мкг/мл, 100 мкг/мл и 1000 мкг/мл НЧ Fe_2O_3 функционализированных порфирином по сравнению с контрольной группой (кровь без НЧ, чистая цельная кровь). Похожие результаты были получены для не покрытых порфирином НЧ: увеличение $T_{1/2}$ на $5 \pm 3\%$, $19 \pm 8\%$, $159 \pm 18\%$ (см. рис. 2).

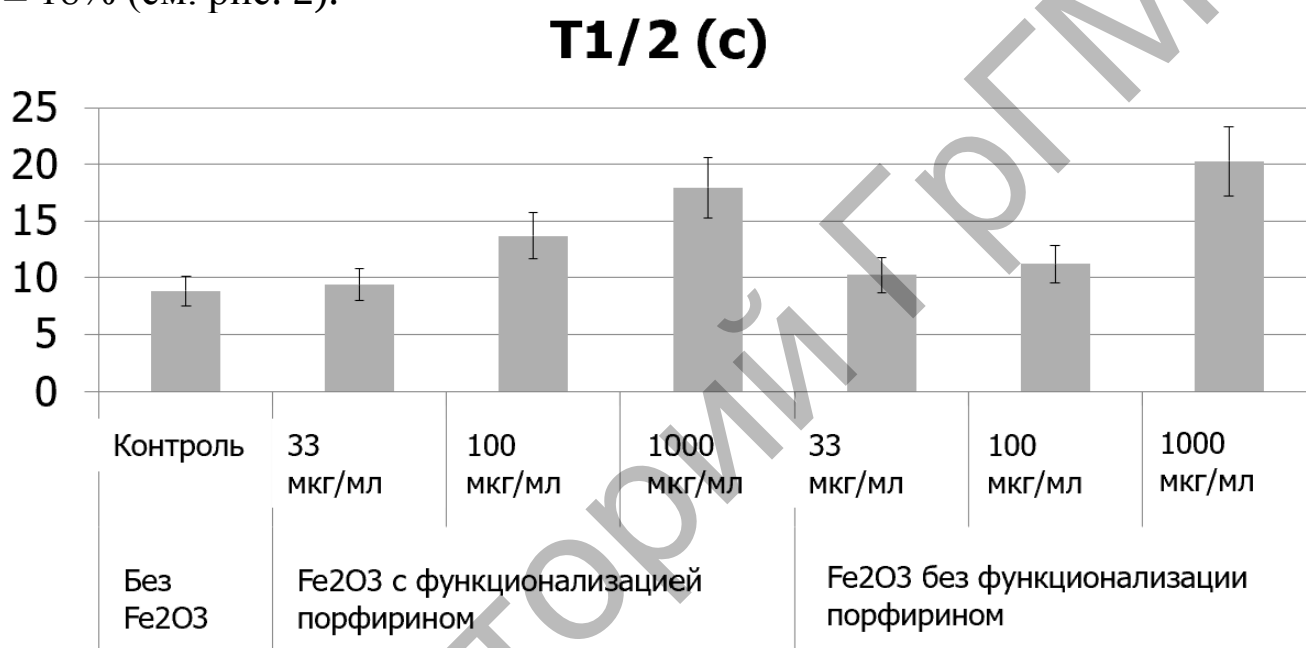


Рис. 2. Характерное время образования агрегатов эритроцитов без и после 45 минутной инкубации крови с частицами Fe_2O_3 в различной концентрации. Изменения достоверно значимы ($p < 0.05$) по сравнению с контролем.

Индекс агрегации (AI) эритроцитов достоверно уменьшался на $3 \pm 2\%$, $11 \pm 8\%$, $23 \pm 11\%$ для случая НЧ с порфирином и $2 \pm 1\%$, $7 \pm 4\%$, $30 \pm 14\%$ для чистых частиц Fe_2O_3 при концентрациях 33 мкг/мл, 100 мкг/мл и 1000 мкг/мл соответственно (см. рис. 3). Изменения агрегации (замедление скорости агрегации и уменьшение доли агрегированных частиц) были тем больше, чем больше концентрации НЧ. При одинаковых концентрациях изменения более выражены для не покрытых порфирином НЧ.

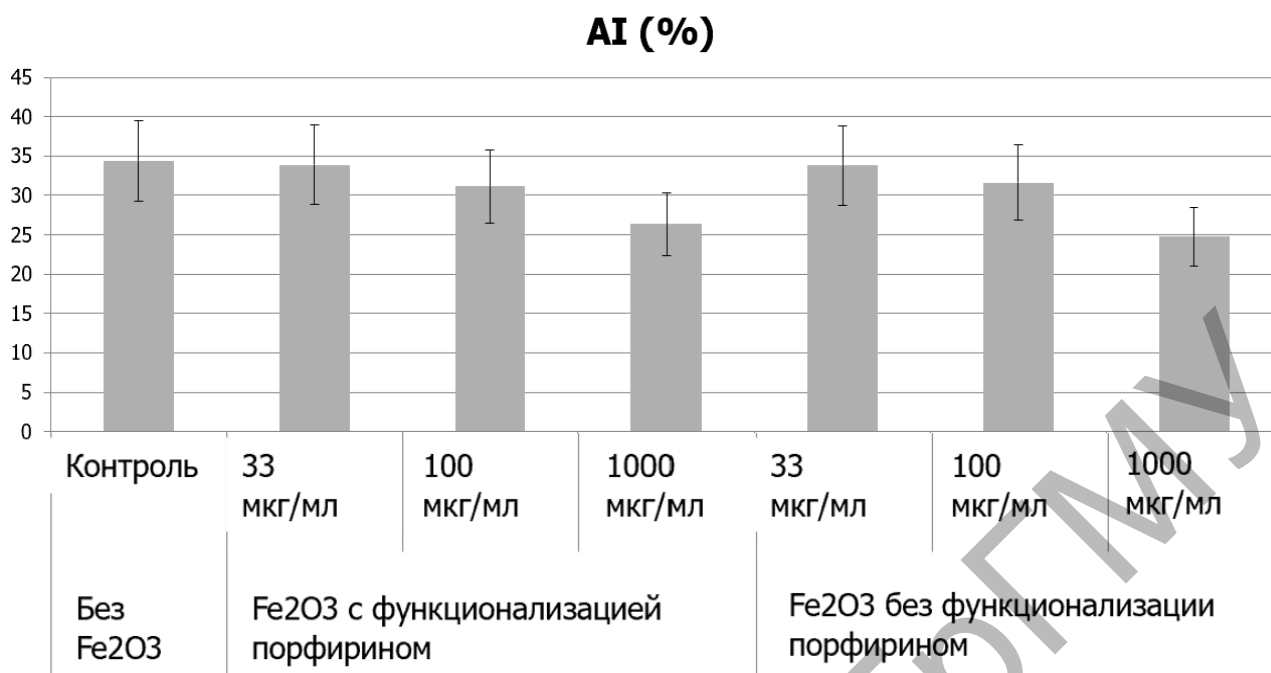


Рис. 3. Индекс агрегации (AI) крови без и после 45 минутной инкубации крови с частицами Fe_2O_3 в различной концентрации. Изменения достоверно значимы ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой.

Было показано, что гидродинамическая прочность агрегатов (критическое сдвиговое напряжение – CSS) достоверно уменьшалось на 15-62% в зависимости от типа частиц и их концентрации (рис. 4).

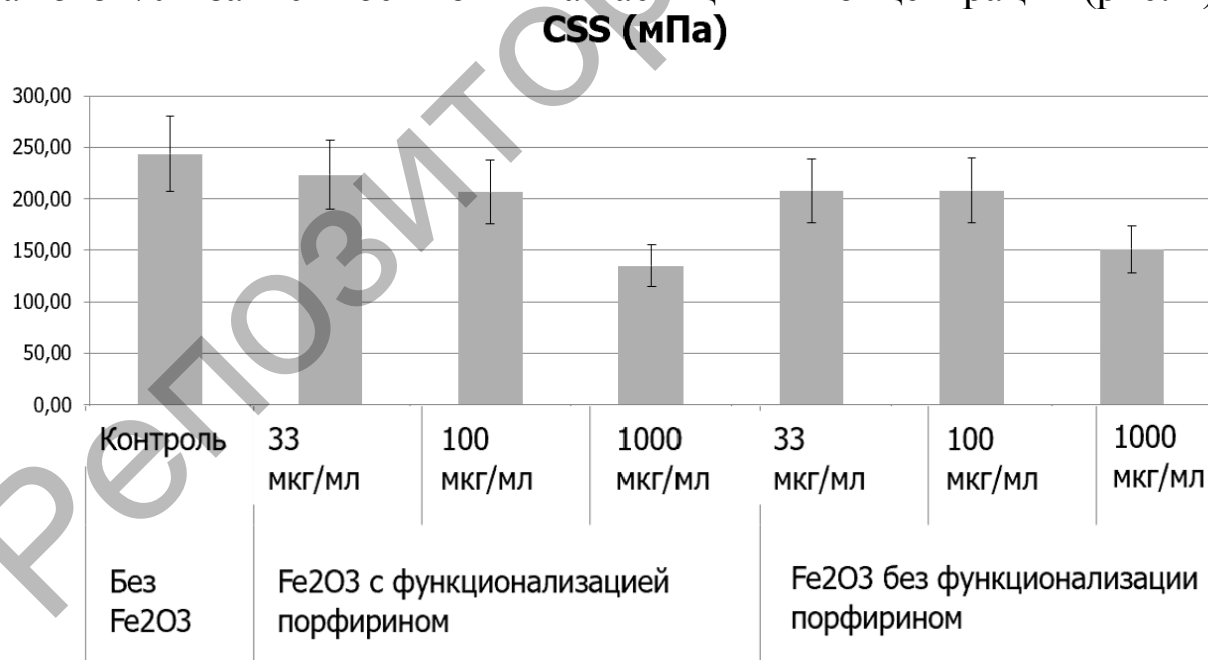


Рис. 4. Гидродинамическая прочность – CSS агрегатов эритроцитов без и после 45 минутной инкубации крови с частицами Fe_2O_3 в различной концентрации. Изменения достоверно значимы ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой

На рисунке 5 представлено изображение, полученное методом флуоресцентной лазерной конфокальной микроскопии. По полученному от НЧ флуоресцентному сигналу видно, что НЧ оксида железа адсорбируются на мембране эритроцитов, что и приводит к изменению свойств эритроцитов агрегировать.



Рис. 5. Двухфотонная флуоресцентная визуализация суспензии эритроцитов инкубированной с НЧ Fe₂O₃.

Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод о том, что НЧ оксида железа являются антиагрегантами, и их антиагрегационный эффект растет с концентрацией и более выражен для покрытых порфирином частиц. Принимая во внимание полученные результаты, можно сделать вывод о том, что введение НЧ Fe₂O₃ при соответствующих условиях и концентрациях ниже 100 мкг/мл не приведет к существенным изменениям микрореологических параметров и осложнениям в реологии крови.

Однако, необходим контроль микрореологических параметров при использовании НЧ оксида железа в медицинских применениях.

ВЫВОДЫ

Наночастицы Fe_2O_3 можно вводить в кровь в условиях окружающей среды при низких концентрациях (33 мкг/мл). Такие концентрации не приводят к существенным изменениям микрореологических параметров эритроцитов и не сказываются на микрореологии крови.

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина» и при финансовой поддержке гранта РНФ № 20-45-08004.

Библиографический список

1. Куликова М., Кочубей В.И. Синтез и оптические свойства наночастиц оксида железа для фотодинамической терапии // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 4(4), 206-209 (2012).
2. Petrov P.O. Photodynamic action on microorganisms using Fe_2O_3 nanoparticles and LED blue (405 nm) light // Proceeding of SPIE: Mechanisms of Low-Light Therapy VII, v. 8211, 82110L (2012).
3. Тучина Е.С. Фотодинамическое воздействие на микроорганизмы с использованием синего (405 нм) излучения и наночастиц оксида железа (III) // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия, биология, экология, 12(1), 61-66 (2012).
4. Baskurt O.K. et al. Comparison of three instruments for measuring red blood cell aggregation // Clin. Hemorheol. Microcirc., 43(4), 283-298 (2009).
5. Shin S., Hou J., Suh J., Singh M. Validation and application of a microfluidic ektacytometer (RheoScan-D) in measuring erythrocyte deformability // Clin. Hemorheol. Microcirc., 37(4), 319-328 (2007).