

УДК 577.352.3

ВЛИЯНИЕ ГИДРОЗОЛЕЙ СЕРЕБРА НА СТРУКТУРНУЮ ЦЕЛОСТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

А. С. Сарычева¹, Е. Ю. Паршина², А. А. Байжуманов²,
А. А. Семенова¹, Е. А. Гудилин^{1,3}, Г. В. Максимов²

¹ Факультет наук о материалах, ² Биологический факультет, ³ Химический факультет
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

assergevna@gmail.com

PACS 81.07.-b, 87.16.D

Актуальной задачей в настоящее время является синтез наночастиц серебра, обладающих плазмонным резонансом и позволяющих регистрировать сигнал гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), особенно от живых клеток. Важным условием является сохранение целостности мембраны клетки при взаимодействии с наночастицами. В данной статье обсуждается влияние коллоидных растворов наночастиц серебра (гидрозолей) на структуру эритроцитов. В настоящей работе выявлена антиоксидантная активность гидрозолей серебра и исследовано их гемолитическое действие. Показано, что наночастицы, инкубированные в буфере, не содержащем хлорид-ионы, которые способны связывать Ag^+ , подвергались гемолизу в большей степени, что свидетельствует об участии в процессе разрушения мембраны эритроцитов ионов серебра, диссоциирующих с поверхности наночастиц.

Ключевые слова: наночастицы серебра, эритроцит, токсичность, гемолиз, FRAP метод.

1. Введение

Одним из возможных вариантов практического использования НЧ серебра является применение их для получения сигнала гигантского комбинационного рассеяния, в последнее время НЧ серебра используют для регистрации сигнала ГКР от живых, неповрежденных клеток [1–6]. Важным условием регистрации сигнала ГКР в суспензии живых клеток является отсутствие деструктивного влияния НЧ серебра на клетки. Анализ литературы показал, что в настоящий момент существует ограниченное число исследований по действию наноматериалов на свойства крови при их введении в кровь *in vitro* или введении в организм в экспериментах *in vivo*. В нашей группе ранее были проведены исследования действия раствора гидрозолей серебра, позволяющих регистрировать сигнал ГКР, на свойства эритроцитов [1]. Было выявлено отсутствие выраженного влияния НЧ на морфологию клеток, отсутствие изменения мембранной структуры и небольшой протекторный эффект в отношении спонтанного гемолиза эритроцитов. Это до некоторой степени противоречило имеющимся в литературе данным о повреждающем действии НЧ серебра в отношении мембран эритроцитов. Так, в работе [2] была изучена гемолитическая активность наночастиц серебра и показано, что в концентрации 10 мг/мл наночастицы серебра (средний диаметр частиц 3 нм) вызывают 6% гемолиз, что, однако, меньше, чем при действии амфотерицина В в той же концентрации. Такую разницу с нашими результатами можно объяснить разной концентрацией наночастиц серебра, а также меньшим размером наночастиц серебра у авторов [2]. Гемолитическое действие непосредственно ионов серебра было показано в работе [3]. Нитрат серебра вызывал достоверный, хотя и небольшой по величине (2–4%)

спонтанный гемолиз в концентрациях 50 нМ и более. Кроме того, было показано, что нитрат серебра вызывает апоптоз эритроцитов — запрограммированную клеточную гибель, в безъядерных клетках эритроцитах связанный с экспозицией молекул фосфатидилсерина во внешнем монослое мембраны, увеличением содержания кальция в клетке и уменьшением объема клетки. Однако сравнение результатов, полученных в работах разных авторов осложняется вследствие разных концентраций, размеров и методов синтеза используемых НЧ.

В настоящее время обсуждается усиленное образование свободных радикалов кислорода на поверхности наночастиц благородных металлов с диаметром менее 5 нм. В связи с этим, безусловно, большой интерес представляют исследования действия наночастиц на антиоксидантные ферменты в условиях *in vivo* и *in vitro*. В настоящий момент отсутствуют данные по действию наночастиц серебра на антиоксидантные ферменты крови, однако в работе [4] продемонстрировано, что в тканях у мальков *Danio rerio*, выращенных в воде с наночастицами серебра, каталазная активность увеличивается, при этом эффект зависит от размеров наночастиц.

Важным моментом при добавлении НЧ серебра к живым клеткам является возможность взаимодействия НЧ не только с поверхностью клетки, но и со средой инкубации, которая в случае большинства клеток содержит ионы хлора. Ионы серебра, диссоциирующие с поверхности НЧ, могут связываться хлорид-ионами. В настоящей работе был произведен подбор условий регистрации степени гемолиза под действием наночастиц, удовлетворяющих следующим требованиям: клетки в среде инкубации сохраняют свою морфологию и структурную целостность, НЧ серебра не образуют крупных агрегатов, среда не содержит ионов хлора.

Информация о механизмах влияния наночастиц на клетки крови человека позволит сконструировать наночастицы, обладающие оптимальными характеристиками для усиления сигнала КР и не оказывающие деструктивного влияния на клетки. В связи с этим целью данной работы является определение возможных механизмов влияния гидрозолей серебра на мембрану эритроцита.

2. Материалы и методы

Гидрозоль серебра (НЧ 1) получали по методу, описанному в работе [5]. Данный метод основан на восстановлении серебра из нитрата серебра в щелочной среде при помощи гидрохлорида гидроксиламина. Концентрация серебра в коллоидном растворе по нитрату составляла 1 мМ. Гидрозоли серебра (НЧ 2 и НЧ 3) были получены в два этапа: сначала были синтезированы затравки с характерным размером частиц 10 нм восстановлением ионов серебра боргидридом натрия NaBH_4 (НЧ 2). В последующем полученные затравки вводились в реакционную смесь, в которой проводили восстановление нитрата серебра аскорбиновой кислотой в присутствии поливинилпироллидона. В результате полученные частицы имели форму пластинок (НЧ 3). Для характеристики полученных НЧ серебра были использованы методы ПЭМ (LEO912 AB OMEGA, Carl Zeiss) и динамического светорассеяния (Zetasizer nano ZS, Malvern, UK).

Антиоксидантную способность гидрозолей серебра (НЧ 1) определяли по их способности восстанавливать железо. Данный метод (метод FRAP) основан на измерении образования восстановленного комплекса железа с 2,4,6-трипиредилтриазином, поглощающего при 593 нм. Измерения проводятся в ацетатном буфере при pH=3,6. Пробы готовили следующим образом: к 3мл раствора FRAP добавляли 100мкл коллоидов и 300мкл воды. Производили измерения образцов при длине волны 593 нм против образца без коллоидов течение 10 минут после добавления коллоидов.

Морфологию эритроцитов исследовали методом световой микроскопии. Эритроциты фиксировали 0.1% глутаровым альдегидом (Sigma, USA) [7]. После отмывки фиксирующего агента суспензию клеток наносили в виде мазка на предметное стекло и фотографировали при помощи светового микроскопа (Axioplan, Zeiss).

Гемолитическое действие НЧ исследовали путем подсчета количества клеток в камере Горяева. Для этого кровь разводили в 100 раз в гипертоническом буфере (буфер А, мольное соотношение: 241.67 NaCl, 8.33 KCl, 1.67 CaCl₂, 1.67 MgSO₄, 6.67 Na₂HPO₄, 1.67 NaH₂PO₄ × 2H₂O или его аналог, в котором все хлориды заменены на соответствующие нитраты) и смешивали с соответствующим количеством раствора наночастиц (объемные отношения раствора наночастиц к суспензии эритроцитов составляли 2:3, полученная суспензия была изотонична плазме крови и не вызывала гипотонического гемолиза эритроцитов), после чего помещали в камеру Горяева. Контролем служили пробы эритроцитов в изотоническом буфере А (мольное соотношение: 145 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgSO₄, 4 Na₂HPO₄ × 12H₂O, 1 NaH₂PO₄ × 2H₂O) без добавления НЧ. Была определена концентрация неразрушенных эритроцитов в пробах при различных временах инкубации с НЧ.

3. Результаты и обсуждения

На рис. 1а представлены микрофотографии полученных НЧ 1. Видно, что частицы имеют в основном сферическую форму, встречаются также и эллипсоидные и палочкообразные НЧ. На рис. 1б показано распределение НЧ по размерам, полученное методами ПЭМ (гистограмма) и методом динамического светорассеяния (врезка). Видно, что размеры НЧ имеют бимодальное распределение, имеется фракция мелких НЧ со средним диаметром порядка 10 нм, и более крупных — средний диаметр около 40–50 нм.

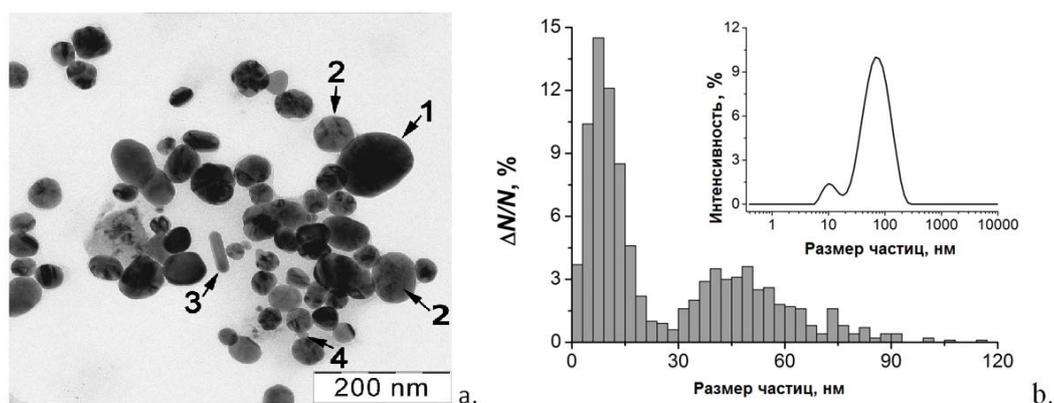


РИС. 1. Характеристики ансамбля наночастиц серебра. (а) ПЭМ изображение сферических наночастиц, приготовленных по методу Леопольда и Лендла. (б) Распределение частиц по размеру

Для того, чтобы выяснить обладают ли коллоидные растворы серебра потенциально про- или антиоксидантными свойствами проводили определение антиоксидантной активности коллоидных растворов методом измерения их способности восстанавливать железо (FRAP) [6].

На рис. 2 представлены типичные кривые кинетики образования Fe(II) комплекса с трипиридилтриазином при добавлении коллоидного раствора серебра (1), (проба 1), и при добавлении раствора, который содержал все компоненты, которые используются для приготовления коллоидного раствора серебра кроме гидроксилamina (2), (проба 2). Полученные

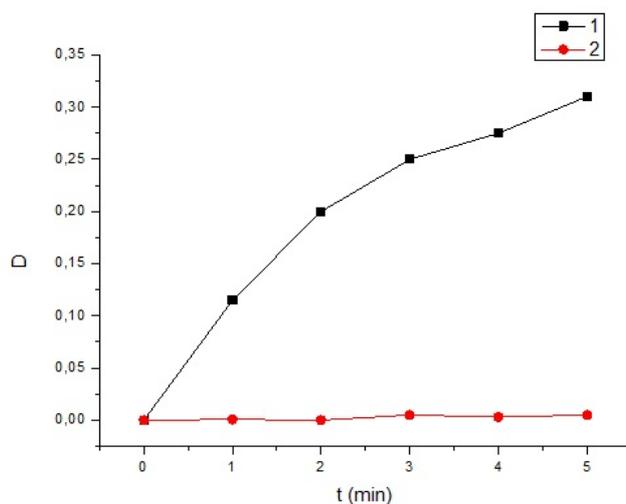


Рис. 2. Кинетические кривые образования Fe(II) комплекса с трипиридилтриазином в пробах 1 и 2

нами данные позволяют объяснить полученные в более ранних работах результаты [1], где было показано, что НЧ, синтезированные по методу [5], вызывают уменьшение спонтанного гемолиза и не оказывают значительного влияния на морфологию эритроцитов. Мембранотропное и гемолитическое действие НЧ серебра могут вносить вклад остатки продуктов реакции, используемых при синтезе НЧ.

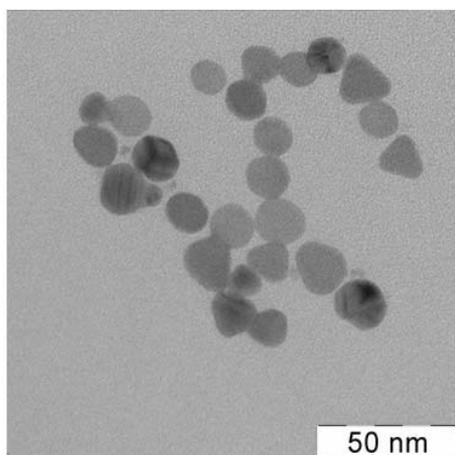


Рис. 3. Микрофотография ПЭМ наночастиц в форме пластинок (НЧ 3)

Роль ионов серебра в гемолитическом действии НЧ серебра была исследована на примере НЧ, синтезированных в ходе двухстадийного процесса. Наночастицы были получены в два этапа: сначала были синтезированы затравки с характерным размером частиц 10 нм восстановлением ионов Ag^+ NaBH_4 (НЧ 2). В последующем полученные затравки подверглись дальнейшему восстановлению аскорбиновой кислотой. В результате полученные частицы имели форму пластинок (НЧ 3) (рис. 3).

Широко обсуждаемым механизмом повреждающего действия НЧ серебра на живые клетки является диссоциация с поверхности НЧ ионов серебра и вызываемые ими повреждения белков, а также генерация активных форм кислорода. В то же время в растворе для инкубации клеток, как правило, содержатся ионы хлора, которые могут связывать ионы

серебра и вызывать таким образом снижение их концентрации в растворе. Для того, чтобы исследовать токсическое действие различных по форме НЧ — сферических НЧ 2 и НЧ 3, имеющих форму пластинок, окруженных «шубой» из ионов хлора и без нее на эритроциты млекопитающих были подобраны специальные условия инкубации клеток в растворах, не содержащих ионов хлора. В качестве ионов, замещающих хлорид-анион, вызывающих агрегацию НЧ серебра, нами были выбраны нитрат-анион и ацетат-анион, которые используются для приготовления сред инкубации эритроцитов в случаях, когда присутствие ионов хлора нежелательно. В буфере, содержащем ацетат-анион, наблюдался высокий уровень спонтанного гемолиза (данные не представлены), поэтому для исследований был выбран буфер, содержащий нитраты.

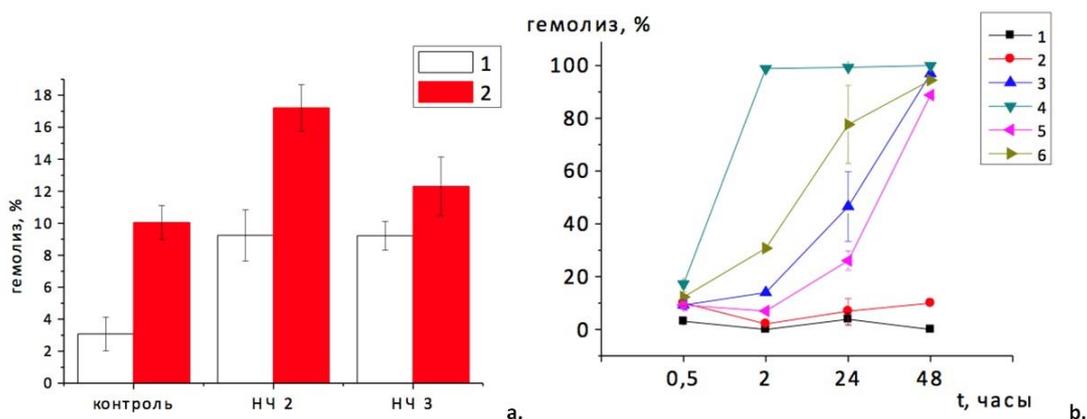


РИС. 4. Влияние НЧ 2 и НЧ 3 на эритроциты. (а) Гемолиз эритроцитов при действии НЧ 2 и НЧ 3 в течение 30 мин: 1 — в буфере А, 2 — в нитрат-содержащем буфере. (б) Динамика гемолиза при воздействии НЧ 2 и НЧ 3, 1 — контроль в буфере А, 2 — контроль в нитрат-содержащем буфере, 3 — НЧ 2 в буфере А, 4 — НЧ 2 в нитрат-содержащем буфере, 5 — НЧ 3 в буфере А, 6 — НЧ 3 в нитрат-содержащем буфере

В нитрат-содержащем буфере содержалось несколько большее количество эхиноцитов, чем в буфере Аллена. Добавление НЧ 2 несколько меняет морфологическую картину как в буфере Аллена, так и — в большей степени — в буфере, содержащем нитраты. Наблюдается образование стоматоцитов и, в случае нитрат-содержащего буфера — сфероцитов, являющихся предлитическими формами клеток. При добавлении НЧ 3, имеющих форму пластинок, форма клеток в буфере Аллена близка к нормальной, в то время как в нитрат-содержащем буфере наблюдается большое количество стоматоцитов и сфероцитов.

На рис. 4. представлены значения величины гемолиза, полученные методом подсчета клеток в камере Горяева. Видно, что наименьшие значения гемолиза наблюдаются в пробе без НЧ в буфере Аллена, в то время как буфер, содержащий нитраты, вызывает небольшой гемолиз. Наибольшие значения гемолиза наблюдаются при добавлении НЧ 2 в нитрат-содержащем буфере. По-видимому, это связано с тем, что гемолитическое действие оказывают ионы серебра, в хлорид-содержащем буфере они связываются ионами хлора, в то время как в буфере, где ионы хлора заменены на нитрат-ионы, остаются свободными. Добавление НЧ 3 в виде пластинок в нитрат-содержащем буфере вызывает меньший гемолиз, чем добавление НЧ 2. Это может быть связано с меньшими размерами НЧ 2 и, соответственно, с большей площадью поверхности и большей концентрацией диссоциирующих с поверхности ионов серебра. В хлорид-содержащем буфере (буфере Аллена) добавление как НЧ 2, так и НЧ 3 в виде пластинок вызывает небольшой гемолиз.

Результаты морфологического анализа частично соответствуют результатам исследования гемолиза: наибольшие изменения морфологии наблюдаются при действии НЧ 2 в нитрат-содержащем буфере. В то же время большое количество модифицированных клеток наблюдается и при действии НЧ 3, в то время как гемолиз в этом случае близок к контрольным значениям.

4. Выводы

Таким образом, показано, что хотя исследованные НЧ 1 не вызывают изменений морфологии и свойств эритроцитов, за исключением увеличения устойчивости к спонтанному гемолизу, они могут оказывать антиоксидантное действие вследствие наличия остатков восстановителя в среде. Максимальное повреждение клеток наблюдается при добавлении НЧ 2 в нитрат-содержащем буфере (не содержащем ионы Cl^-). Поскольку повреждение клеток при добавлении НЧ в буфере, содержащем нитраты, более выражено, по-видимому, повреждающее воздействие вызывают диссоциирующие с поверхности НЧ ионы серебра, которые в случае хлорид-содержащего буфера могут частично связываться ионами хлора.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, гранты 10-04-00835-а и 11-03-00761-а в рамках Программы приоритетного развития МГУ.

Литература

- [1] N.A. Brazhe, S. Abdali, A.R. Brazhe, O.G. Luneva, N.Y. Bryzgalova, E.Y. Parshina, O.V. Sosnovtseva, G.V. Maksimov. New insight into erythrocyte through in vivo surface enhanced Raman spectroscopy. // *Biophysical J.* — 2009. — V. 97, № 12. — P. 3206–3214.
- [2] K.J. Kim, W.S. Sung, B.K. Suh, S.K. Moon, J.S. Choi, J.G. Kim, D.G. Lee, Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans* // *Biometals.* — 2009. — V. 22. — P. 235–242.
- [3] N. Leopold, B. Lendl. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride // *J. Phys. Chem.* — 2003. — B 107. — P. 5723–5727.
- [4] M. Sopjani, M. Föllner, J. Haendeler, F. Götz, F. Langa. Silver ion-induced suicidal erythrocyte death // *J. Appl. Toxicol.* — 2009. — V. 29. — P. 531–536.
- [5] I.F. Benzie, J.J. Strain: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. // *Analytical Biochemistry.* — 1996. — V. 239. — P. 70–76.
- [6] Г.В. Максимов, Н.А. Браже, А.И. Юсипович, Е.Ю. Паршина, О.В. Родненков, А.Б. Рубин, Г.Г. Левин, В.А. Быков. Использование наночастиц для исследования конформаций примембранного гемоглобина // *Биофизика.* — 2011. — Т. 56. — С. 1099–1104.
- [7] Е.Ю. Паршина, Л.Я. Гендель, А.Б. Рубин. Влияние новых гибридных антиоксидантов — ихфанов — на морфологию эритроцитов // *Биофизика.* — 2004. — Т. 49, № 6. — С. 1094–1098

INFLUENCE OF SILVER HYDROSOLS ON STRUCTURAL INTEGRITY OF ERYTHROCYTES

A. S. Sarycheva¹, E. Yu. Parshina², A. A. Baydjanov²,
A. A. Semenova¹, E. A. Goodilin^{1,3}, G. V. Maximov²

¹Department of Materials Science, ²Department of Biology ³Chemistry department,
M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The paper analyses the effect of silver nanoparticles on structural integrity of erythrocytes in hemolysis depending on nanoparticle size and morphology. It is shown that smaller nanoparticles might cause erythrocyte destruction while chloride ions seem to slow down such a process.

Keywords: silver metal nanoparticles, erythrocyte, toxicity, hemolysis, FRAP method.