

УДК [544.774.4+576.31+539.31]:539.25

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМЕРНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Г.Б. МЕЛЬНИКОВА¹⁺, Т.Н. ТОЛСТАЯ¹, А.С. ПЕТРОВСКАЯ¹, О.Н. ШИШКО², Е.Э. КОНСТАНТИНОВА¹, С.А. ЧИЖИК¹, Н. АНТОНОВА³

¹Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси, ул. П. Бровки, 15, 220072, г. Минск, Беларусь.

²Белорусский государственный медицинский университет, пр-т Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Беларусь.

³Институт механики Болгарской академии наук, ул. Акад. Г. Бончева, бл. 4, 1113, г. София, Болгария.

Методом атомно-силовой микроскопии проведено исследование влияния наночастиц полиакриловой кислоты на локальные механические свойства мембран эритроцитов пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Показано, что звездообразные наночастицы с M_n 57000 Да ($c = 0,2$ и 1 мг/мл) не оказывают влияния на структурные и локальные механические свойства эритроцитарной мембраны. С увеличением молекулярной массы и концентрации наночастиц полиакриловой кислоты уменьшается степень взаимодействия кислоты с мембраной эритроцитов.

Ключевые слова: полимерные наночастицы, эритроцитарная мембрана, структура, адгезия, модуль упругости, атомно-силовая микроскопия.

Введение

В связи с развитием технологий микрокапсулирования, адресной доставки лекарственных веществ, изучение влияния наночастиц, на основе которых создаются микрокапсулы, на структурно-механические свойства мембран биологических клеток является актуальным. Ведутся исследования по изучению изменений свойств клеточных мембран под влиянием наночастиц, диоксида титана [1], шунгитового углерода [2], серебра [3], золота [4], а также полимерных нано- и микрочастиц [5]. Следует отметить, что при взаимодействии наночастиц металлов происходит повреждение клеток крови. В работе [6] показано, что в результате инкубирования красных клеток крови с растворами наночастиц различного заряда и концентрации эритроциты претерпевают морфологические изменения, которые выражаются в трансформации клеток из равновесной формы – дискоцитов – в патологические.

Показано, что частицы полистирола размером свыше 220 нм адсорбируются на поверхности эритроцитарной мембраны за счет образования водородных связей, ван-дер-ваальсового и электростатического взаимодействия, однако осажденные наночастицы не влияют на циркуляцию клеток крови [7]. Во многих исследованиях используются наночастицы с диаметром менее 150 нм, однако в ряде работ

показано, что применение наночастиц большего диаметра позволяет увеличить время циркуляции частиц в системе кровотока, тем самым увеличивая время доставки лекарственных препаратов [8, 9].

Значительный интерес представляет изучение свойств полиакриловой кислоты (ПАК), её реологических характеристик при различных рН раствора [10]. ПАК, модифицированная различными по природе наночастицами, обладает антибактериальными, сенсорными и другими свойствами, а также позволяет повысить микропористость материала [11–13]. Несомненно, актуален вопрос цитотоксичности [14], а также изменения свойств биологических клеток в результате воздействия наночастиц ПАК и их производных.

Одним из современных методов неразрушающего контроля морфологии, структуры, свойств нанообъектов, а также их изменений под влиянием внешних факторов является атомно-силовая микроскопия (АСМ) [15]. В настоящей работе методами АСМ изучено влияние наночастиц ПАК с различной молекулярной массой на структурные и локальные механические свойства эритроцитов.

Цель работы — изучить влияние наночастиц полиакриловой кислоты на структурные и механические свойства мембран эритроцитов методом атомно-силовой микроскопии.

⁺ Автор, с которым следует вести переписку. E-mail: galachka@gmail.com

Материалы и методы исследования

Эритроциты для исследования методом АСМ выделяли из стабилизированной этилендиаминтетраацетатом калия венозной крови пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2). Средний возраст пациентов $55,6 \pm 5,2$ года.

Для изучения воздействия наночастиц к 0,5 мл «эритроцитарной массы» добавляли 20 мкл раствора наночастиц ПАК. Инкубирование наночастиц с красными клетками крови проводили в течение 20, 40 и 60 мин. Используемые полимерные наночастицы – растворы звездообразного полимера, полученного полимеризацией полистирола и ПАК с Mn 57000 Да (степень полимеризации 58), и линейной ПАК с Mn 6000, 20000, 225000 Да (концентрация $c = 0,2$ и 1 мг/мл) в 0,9% растворе хлорида натрия. Гидродинамический радиус сферических наночастиц 14 нм.

Клетки фиксировали 0,5% раствором глутарового альдегида на подложках слюды.

Изменения модуля упругости (E) изучали методом статической силовой спектроскопии на атомно-силовом микроскопе NT-206 (ОДО «Микротест-машины», Беларусь) с использованием стандартных кремниевых зондов NSC 11, жесткостью 3 Н/м («MikroMasch»), радиусом кривизны 50 нм. Модуль упругости рассчитывали по модели Джонсона – Кендалла – Робертса (Johnson – Kendall – Roberts) [16], учитывающей влияние адгезионных сил.

Степень агрегации эритроцитов определяли по скорости их оседания в стандартизованных стеклянных капиллярах диаметром 3 мм и длиной 200 мм («Drager & Heerhorst GmbH & Co. ЛП», Германия).

Образцы крови инкубировали также в электри-

ческом суховоздушном термостате ТС-1/20СПУ (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) при температуре 41 °С в течение 60 мин.

Результаты и их обсуждение

Исследования структуры эритроцитарных мембран методами атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии показали, что после инкубирования красных клеток с раствором наночастиц следов ПАК на мембране не наблюдалось (рис. 1). Данный факт свидетельствует о полном отмывании эритроцитов после инкубирования и отсутствии взаимодействия между наночастицами ПАК и функциональными группами веществ, входящих в состав мембран клеток.

Показано, что независимо от пола пациента значения локального модуля упругости мембран эритроцитов составляют $96,0 \text{ МПа} \pm 15\%$ и зависят от биохимических показателей крови пациентов с СД2. Диапазон изменения E связан с неоднородностью структурных характеристик эритроцитарной мембраны [17], а также инструментальной ошибкой измерения.

Так как данный параметр имеет вышеуказанный диапазон значений, то для оценки влияния наночастиц ПАК на свойства мембраны определяли изменение E после инкубирования по формуле:

$$\delta = E_1 / E_0,$$

где δ – относительное изменение модуля упругости мембран эритроцитов после инкубирования с наночастицами, отн. ед.;

E_0 – значения модуля упругости мембран исходных эритроцитов, МПа;

E_1 – значения модуля упругости мембран эритроцитов после инкубирования с наночастицами, МПа.

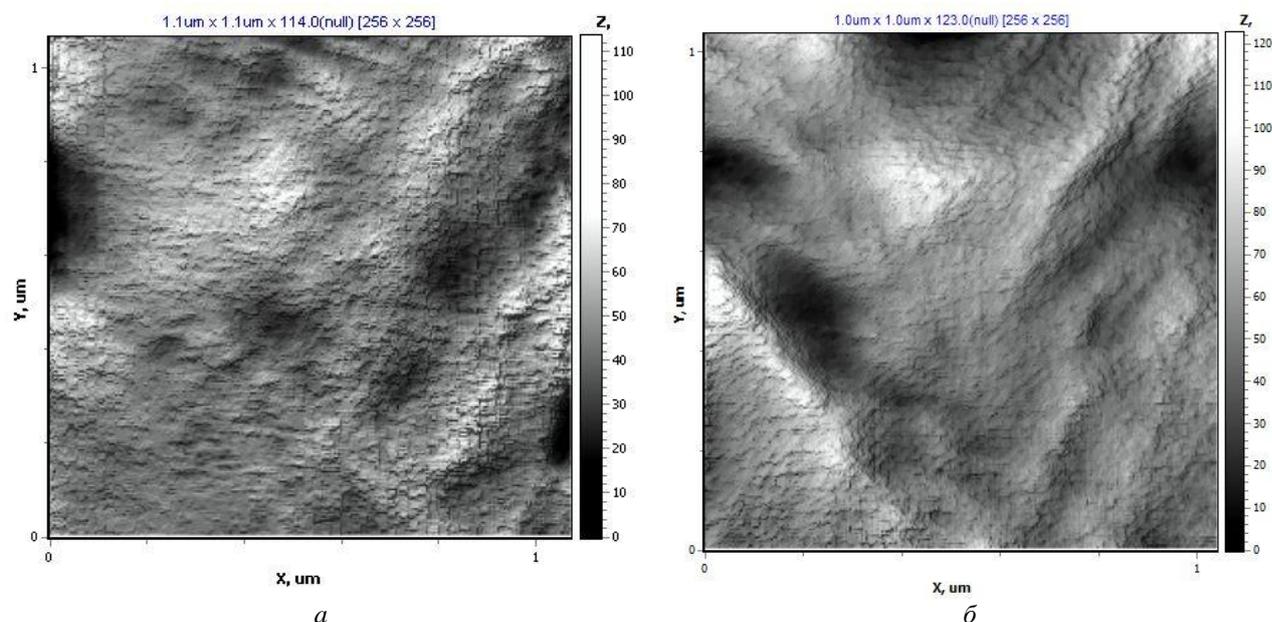


Рисунок 1 — АСМ-изображение в режиме латеральных сил мембраны эритроцита исходной (а) и после инкубирования с наночастицами ПАК (б) в течение 20 мин

Результаты полученных измерений представлены в таблице 1.

Как видно из представленной таблицы, после инкубирования красных кровяных клеток с линейными наночастицами ПАК с $Mn = 6\ 000$ и $20\ 000$ Да в течение 20 и 40 мин установлено значительное изменение модуля упругости (на 44%), что обусловлено взаимодействием наночастиц со структурными компонентами эритроцитарной мембраны.

Влияние наночастиц ПАК при $c = 1$ мг/мл составляет менее 20% и не превышает среднестатистического разброса при различном времени инкубирования. Мы предполагаем, что повышение концентрации линейных наночастиц приводит к возможному увеличению межмолекулярного взаимодействия между молекулами кислоты, тем самым предотвращая воздействие частиц на составляющие мембраны.

В результате воздействия раствора звездообразных наночастиц ПАК с $Mn\ 57\ 000$ Да ($c = 0,2$ и 1 мг/мл) при различном времени инкубирования не наблюдается изменений структурно-механических свойств мембран клеток пациентов СД2. Возможно, такие наночастицы могут быть использованы в качестве носителей активных лекарственных веществ.

Для исключения влияния растворителя, в котором находятся наночастицы, дополнительно было проведено исследование влияния физиологического

раствора на свойства эритроцитов. После инкубирования с физиологическим раствором модуль упругости не изменяется. Таким образом, можно предположить, что изменения свойств клеточной мембраны, описанные выше, связаны с влиянием наночастиц ПАК, их структурой и взаимодействием с компонентами мембран эритроцитов.

Для усиления влияния воздействия наночастиц на красные клетки крови, образцы с наночастицами с $Mn\ 225\ 000$ Да нагревали при температуре $41\ ^\circ\text{C}$ в течение 60 мин и оценивали скорость на стадии основного процесса агрегации (рис. 2).

Показано, что как в результате температурного воздействия, так и после инкубирования при повышенной температуре и с наночастицами имеет место уменьшение скорости агрегации, однако процент изменения составляет 55%. Это обусловлено блокированием агрегационных функций плазменных белков за счет образования с ними межмолекулярного взаимодействия. Поэтому при инкубировании ПАК с эритроцитами взаимодействия наночастиц с клетками не происходит и механические свойства последних не изменяются (таблица 1). Различное изменение скорости агрегации эритроцитов при увеличении температуры и после инкубирования с наночастицами можно объяснить электростатическими свойствами поверхности эритроцитов и биохимическим составом крови различных пациентов.

Таблица 1 — Влияние времени инкубирования, молекулярной массы и концентрации раствора наночастиц ПАК на свойства мембран эритроцитов пациентов с СД2

Время инкубирования, мин	Концентрация раствора наночастиц ПАК, мг/мл	Относительное изменение модуля упругости δ , отн. ед.			
		Молекулярная масса наночастиц ПАК, Да			
		6 000	20 000	57 000	225 000
20	0,2	1,36	1,24	0,83	1,03
40		1,44	1,34	0,90	1,08
60		1,14	1,41	0,96	1,13
20	1	1,19	1,17	0,95	0,91
40		1,15	1,16	0,93	0,99
60		1,07	0,95	1,19	1,24

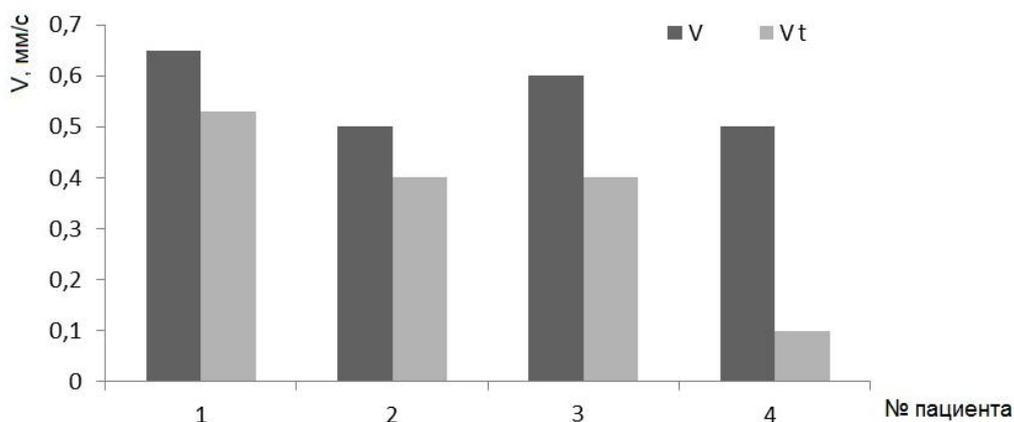


Рисунок 2 — Изменение скорости агрегации эритроцитов

V – скорость агрегации исходных эритроцитов; Vt – скорость агрегации эритроцитов после инкубирования;

1, 2 – без наночастиц; 3, 4 – с наночастицами ПАК ($Mn\ 225\ 000$ Да)

Заключение

Таким образом, на примере эритроцитов пациентов с СД 2 показано, что с увеличением молекулярной массы и концентрации наночастиц ПАК уменьшается степень взаимодействия кислоты с мембраной эритроцитов. Наночастицы с Mn 57 000 Да ($c = 0,2$ и 1 мг/мл) могут найти применение в качестве носителей активных лекарственных веществ. Совместное воздействие температуры и наночастиц ПАК повышает дезагрегационные свойства клеток крови.

Благодарности

Работа выполнена в рамках ГПНИ «Энергетические системы, процессы и технологии», задание 2.2.

Обозначения

АСМ — атомно-силовая микроскопия; ПАК — полиакриловая кислота; СД2 — сахарный диабет 2 типа; E — модуль упругости, МПа; Mn — молекулярная масса; c — концентрация раствора частиц ПАК; δ — относительное изменение модуля упругости мембран эритроцитов после инкубирования с наночастицами, отн. ед.; E_0 — значение модуля упругости мембран исходных эритроцитов; E_1 — значение модуля упругости мембран эритроцитов после инкубирования с наночастицами; V — скорость агрегации исходных эритроцитов; V_t — скорость агрегации эритроцитов после инкубирования.

Литература

- Абдуллин И.Ш. Нанодисперсные материалы на основе диоксида титана в микробиологической, медицинской и пищевой промышленности / И.Ш. Абдуллин [и др.] // Вестник Казанского технологического университета. — 2012. — С. 158–165.
- Горюнов А.С. Морфология и агрегация эритроцитов в нанодисперсиях углерода / А.С. Горюнов [и др.] // Труды Карельского научного центра РАН. — 2009. — № 3. — С. 30–37.
- Сарычева А.С. Влияние гидрозолей серебра на структурную целостность эритроцитов / А.С. Сарычева [и др.] // Наносистемы: физика, химия, математика. — 2013. — Т. 4. — № 1. — С. 66–71.
- Мельникова Г.Б. Влияние наночастиц золота на упругие свойства мембраны эритроцитов / Г.Б. Мельникова [и др.] // Новые функциональные материалы, современные технологии и методы исследования: материалы III Республиканской научно-технической конференции молодых ученых, Гомель, 4–6 ноября 2014 г. — Гомель: ИММС НАН Беларуси, 2014. — С. 96–97.
- Chambers E., Mitragotri S. Prolonged circulation of large polymeric nanoparticles by non-covalent adsorption on erythrocytes // Journal of Controlled Release. — 2004. — Vol. 100. — P. 111–119.
- Kozelskaya A.I. Morphological changes of the red blood cells treated with metal oxide nanoparticles / A.I. Kozelskaya [et al.] // Toxicology in Vitro. — 2016. — Vol. 37. — P. 34–40.
- Moghimi S.M., Hunter A.C. Capture of stealth nanoparticles by the body's immune defenses // Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. — 2001. — Vol. 18. — No. 6. — P. 527–550.
- Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice // Pharmacol. Rev. — 2001. — Vol. 53. — No. 2. — P. 283–318.
- Moghimi S.M., Davis S.S. Innovations in avoiding particle clearance from blood by Kupffer cells: cause for reflection // Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst. — 1994. — Vol. 11. — No. 1. — P. 31–59.
- Luis Alves Björn Lindman Controlling the swelling and rheological properties of hydrophobically modified polyacrylic acid nanoparticles: Role of pH, anionic surfactant and electrolyte / Luis Alves Björn Lindman // Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. — 2014. Vol. 459. P. 233–239.
- Nosrati R., Olad A., Shakoori S. Preparation of an antibacterial, hydrophilic and photocatalytically active polyacrylic coating using TiO₂ nanoparticles sensitized by graphene oxide // Materials Science and Engineering C. — 2017. — Vol. 80. — P. 642–651.
- Guangming Z. Enhancement of Cd(II) adsorption by polyacrylic acid modified magnetic mesoporous carbon / Z. Guangming [et al.] // Chem. Eng. J. — 2015. — Vol. 259. — P. 153–160.
- Yi-Syuan, W., Ko-Shao Ch., Lii-Tzu W. In Situ Synthesis of High Swell Ratio Polyacrylic Acid/Silver Nanocomposite Hydrogels and Their Antimicrobial Properties // Journal of Inorganic Biochemistry. — 2016. — Vol. 164. — P. 17–25.
- Roche K.J., Kenneth T. Stanton Precipitation of biomimetic fluorhydroxyapatite/polyacrylic acid nanostructures // J. of Crystal Growth. 2015. — Vol. 409. — P. 80–88.
- Михаловский И.С., Волянюк Е.Н., Тарасевич В.А., Мельникова Г.Б. Биоцидные субстанции из триглицеридных наноструктур с полигексаметиленгуанидинами для биостойких технологических сред // Полимерные материалы и технологии. — 2016. — Т. 2. — № 3. — С. 63–66.
- Мохаммед Салем А.А., Мельникова Г.Б., Маханёк А.А., Чижик С.А. Методические аспекты определения модуля упругости высокоэластичных материалов и биологических клеток методом силовой спектроскопии // Механика машин, механизмов и материалов — 2015. — № 2 (31). — С. 80–84.
- Мельникова Г.Б., Кужель Н.С., Константинова Е.Э. Построение карт жесткости для оценки механических свойств клеточной мембраны методом атомно-силовой микроскопии // Тепло- и массообмен — 2015. — Минск: Институт тепло- и массообмена имени А.В. Лыкова НАН Беларуси, 2016. — С. 213–216

G.B.Melnikova, T.N.Tolstaya, A.S.Petrovskaya, O.N.Shyshko, E.E.Konstantinova, S.A.Chizhik, N.Antonova

Investigation of the influence of the polymer nanoparticles on the structural-mechanical properties of membranes by atomic force microscopy method

The effect of nanoparticles of polyacrylic acid on local mechanical properties of erythrocyte membranes of patients with type 2 diabetes mellitus was studied by atomic force microscopy. It was shown that star-shaped nanoparticles with Mn 57,000 Da ($c = 0.2$ and 1 mg/ml) do not affect the structural and local mechanical properties of the erythrocyte membrane. The degree of interaction of the acid with the erythrocyte membrane was decreased, as the molecular weight and concentration of polyacrylic acid nanoparticles increase.

Keywords: polymer nanoparticles, erythrocyte membrane, structure, adhesion, elastic modulus, atomic force microscopy.

Поступила в редакцию 03.08.2017

© Г.Б. Мельникова, Т.Н. Толстая, А. С. Петровская, О.Н. Шишко, Е.Э. Константинова, С.А. Чижик, Н. Антонова, 2017