

ИЗМЕНЕНИЯ АРХИТЕКТониКИ И МОрФОМЕТриЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА

© С. Н. Плескова,^{1,*} Е. Е. Горностаева,² Р. Н. Крюков,¹ А. В. Боряков,² С. Ю. Зубков¹

¹ Научно-образовательный центр «Физика твердотельных наноструктур»
Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского,
Нижний Новгород, 603950, и

² Центр коллективного пользования научным оборудованием «Новые материалы
и ресурсосберегающие технологии» Научно-исследовательского института химии
Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603950;

* электронный адрес: pleskova@mail.ru

Разработана новая высокоточная методика расчета отношения площадь/объем эритроцита с использованием атомно-силовой микроскопии. Методика апробирована на эритроцитах здоровых доноров. Методами сканирующей электронной микроскопии, атомно-силовой микроскопии и рентгеновского микроанализа обнаружено, что наночастицы магнетита способны взаимодействовать с мембранами эритроцитов *in vitro*. Результатом взаимодействия является развитие патологии эритроцитов, свойственной пойкилоцитозу и анизоцитозу. При инкубации магнетита с эритроцитами в бессывороточной среде наночастицы агрегируют.

Ключевые слова: эритроциты, отношение площадь/объем, наночастицы магнетита, архитектура, атомно-силовая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, рентгеновский микроанализ.

Принятые сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия, НЧМ — наночастицы магнетита, РМА — рентгеновский микроанализ, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор.

Эритроциты могут рассматриваться в качестве своеобразного «клеточного дозиметра» действия эндо- и экзогенных факторов и уникальной модели для оценки состояния организма (Новицкий и др., 2003). Методологическое удобство использования эритроцитов определяется упрощенной структурой их мембран, сохраняющей функциональные свойства и принцип организации большинства клеточных типов, разнообразием форм патологии мембран и относительной легкостью их получения для исследования (Леонова, 1987). В то же время значимость анализа основных морфологических показателей эритроцитов, в частности выявление особенностей архитектуры и анализ отношения площадь/объем, обусловлены существенной ролью эритроцитов, которую они играют в поддержании гомеостаза. Красные кровяные клетки помимо специфической газотранспортной функции принимают участие в регуляции кислотно-основного состояния, водно-электролитного баланса и микрореологического статуса крови, в иммунных реакциях, связывании и переносе аминокислот, липидов, вирусов и лекарственных веществ (Новицкий и др., 2003). В связи с этим важно находить новые, высокоточные методы оценки структурно-морфологических особенностей эритроцитов.

Наночастицы магнетита (НЧМ) применяются в медицине прежде всего благодаря свойству дистанционной управляемости под действием внешнего магнитного

поля. Основными областями использования НЧМ являются увеличение контрастности и чувствительности магнитно-резонансной томографии, направленная доставка лекарственных препаратов, гипертермия при лечении злокачественных новообразований и диагностика *in vitro* (Pankhurst et al., 2003; Bulte, Kraitchman, 2004; Grancharov et al., 2005; Neamtu, Verga, 2011; Guo et al., 2013). Для использования НЧМ *in vivo* они должны удовлетворять следующим требованиям: 1) образовать устойчивую коллоидную систему в водных растворах, 2) быть резистентными к изменению концентраций солей, pH и температуры в достаточно широких диапазонах, 3) иметь одинаковые размеры и не агрегировать (Першина и др., 2008). Однако прежде всего необходимо, чтобы НЧМ не вызывали альтераций или существенных морфофункциональных изменений клеток крови. В работе Якушевой с соавторами (2013) показано, что внутримышечное введение крысам наночастиц железа (2 мг на 1 кг массы животного) приводит к значительному увеличению числа эритроцитов, концентрации гемоглобина и его среднего содержания, как в 1-е, так и на 7-е сут исследования (Якушева и др., 2013). При однократном интрагастральном введении крысам магнетита $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (100 мг/мл) наблюдали снижение числа эритроцитов при резком увеличении концентрации гемоглобина; кроме того, уменьшались объем, высота и площадь поверхности клетки при неизменном

диаметре эритроцита (Скоркина и др., 2010). Это не согласуется с данными других авторов, которые показали, что *in vitro* НЧМ, покрытые лимонной кислотой, не вызывали гемолиза, агрегации или изменения морфологии эритроцитов (Nasiri et al., 2016).

В связи с вышеизложенным первой задачей настоящей работы являлась разработка методики оценки отношения площадь/объем с использованием атомно-силовой микроскопии (АСМ). В отличие от электронной микроскопии АСМ позволяет с высокой точностью измерять все основные параметры клеток (диаметр, высоту, объем и площадь поверхности), а на клетках с выраженными адгезионными свойствами проводить динамические исследования в физиологической среде без использования фиксации (Плескова, 2011). Вторая задача исследования — определить основные морфологические параметры эритроцитов после инкубации с НЧМ методом АСМ, выяснить изменения архитектуры клеток методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и оценить возможности взаимодействия НЧМ с мембранами эритроцитов методом рентгеновского микроанализа (РМА).

Материал и методика

Выделение клеток. Исследовали венозную кровь здоровых доноров обоего пола в возрасте 20—40 лет. Забор крови производили в утреннее время, после подписания донорами бланка информированного согласия. После однократного центрифугирования (200 g, 3 мин) гепаринизированной крови (50 ЕД/мл) и декантирования плазмы и лейкоцитарно-тромбоцитарного слоя эритроциты пятикратно отмывали PBS, содержащим 0.137 M NaCl и 0.0027 M KCl, pH 7.35. Отбирали 20 мкл эритроцитов, разводили в 50 раз, начальная концентрация клеток составляла $1 \cdot 10^6$ кл./мл (по результатам подсчета в камере Горяева). Эритроциты инкубировали с НЧМ в соотношении 9 : 1 (эксперимент) или с эквивалентным количеством PBS (контроль) 60 мин при 37 °С (Плескова и др., 2013).

Характеристика наночастиц. НЧМ ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) были любезно предоставлены Д. А. Горинным (Кафедра физики полупроводников СГУ им. Н. Г. Чернышевского). Частицы получали методом химической преципитации из раствора солей железа (Fe(II) и Fe(III)) и стабилизировали лимонной кислотой (Герман и др., 2013а). Гидродинамический диаметр и ζ -потенциал НЧМ измеряли на приборе ZetasizerNano (Malvern Instruments Ltd., Великобритания), показатели составили 20 ± 4 нм и -13.09 мВ соответственно. НЧМ перед экспериментами взбалтывали в Vortex (ELMI Ltd., Латвия) в течение 10 мин, диспергировали в ультразвуковой ванне (РЭЛ-ТЭК, Москва) 15 мин, добиваясь однородности, после чего использовали для инкубации с эритроцитами в конечных концентрациях, не влияющих на жизнеспособность нейтрофилов, — 0.0018 и 0.18 мг/мл (Герман и др., 2013б).

Метод АСМ. Эритроциты переносили на поверхность предметных стекол и фиксировали глутаральдегидом (2.5 %, 20 мин, 24 °С), трижды отмывали в PBS и сканировали в полуконтактном режиме на воздухе с помощью прибора Ntegra Spectra (NT-MDT, Россия). Для обработки результатов сканирования использовали программный пакет Gwyddion (факультет нанометрологии Чешского метрологического института, Чехия). Исполь-

зовали зонды DNP (Bruker, США) с радиусом закругления кончика 20 нм, углом при вершине 15 град, резонансной частотой около 65 кГц и константой жесткости 0.35 Н/м. Основные морфологические параметры эритроцитов — диаметр, высота в зоне тора, высота в зоне пеллора (если он был оформлен), площадь поверхности и объем — оценивали в пакете Gwyddion.

Методы СЭМ и РМА. Подготовку клеток осуществляли, как и для АСМ, но в качестве подложки использовали алюминий или золото (Au/GaAs). Использование двух различных по атомному номеру материалов обусловлено необходимостью получения сканов разного уровня контраста. Исследования проводили на электронном микроскопе JSM-IT300LV (JEOL, Япония) в режиме высокого вакуума при ускоряющем напряжении 5 и 20 кВ, диаметр электронного пучка достигал 5 нм. Для проведения рентгеновского микроанализа (РМА) использовали энергодисперсионную приставку X-Max^N 20 (Oxford Instruments, Великобритания), пространственное разрешение составило ~ 0.25 мкм. Режим РМА использовали для построения карт распределения элементов (растр-сканирования 256 · 256 или 512 · 512 точек) по поверхности и определения состава в определенных точках. Время накопления всей карты составляло около 1 ч, в каждой отдельной точке сканирования происходило накопление собственного спектра. Ток пучка не превышал 0.5 нА для минимизации воздействия на клетки.

Статистический анализ. Определяли границы нормального распределения количественных показателей выборок с использованием критерия Шапиро—Уилка. В случае нормального распределения для сравнения дисперсий средних значений контроля и эксперимента использовали критерий Стьюдента для независимых выборок (параметрическая статистика), в случае ненормального распределения — двухвыборочный критерий Вилкоксона (непараметрическая статистика). Различия между двумя выборками считали статистически значимыми при $P < 0.05$. Для статистического анализа использовали программу Origin Pro 8 (OriginLab Corporation, США).

Результаты и обсуждение

Нормоциты характеризуются высоким отношением площади поверхности к объему, что обеспечивает максимальную близость гемоглобина к поверхности и, таким образом, максимальную скорость газообмена (Боровская и др., 2010). Отношение площадь/объем снижается при трансформации эритроцитов в любую патологическую форму. Мы предлагаем метод точной количественной оценки основных параметров клетки на основании измерений эритроцитов методом АСМ, в котором микроскоп сканирует поверхность клетки, предоставляя массив данных, который трансформируется в реальное трехмерное (3D) изображение. Затем программа обработки изображения позволяет с нанометровой точностью измерить площадь поверхности эритроцита, площадь проекции клетки на плоскость, объем эритроцита (рис. 1), его высоту и диаметр (рис. 2).

Известно (O'Reilly et al., 2001), что процедура иммобилизации эритроцитов на подложке при подготовке для АСМ не приводит к артефактам количественной оценки, поскольку средний объем иммобилизованных клеток точно коррелирует с параметрами среднего объема клеток,

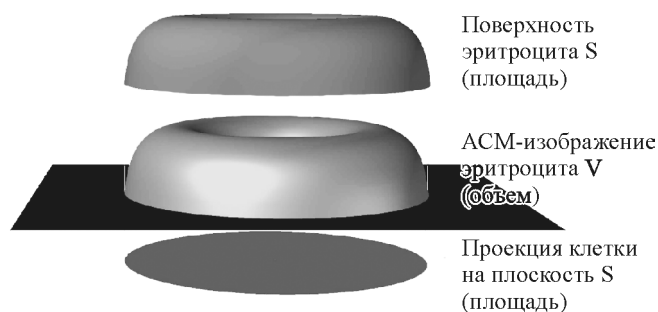


Рис. 1. Схема измерения отношения S/V эритроцита.

Суммировали площадь поверхности эритроцита (верхняя часть клетки) и нижней части клетки, связанной с подложкой (проекция клетки на плоскость), делили на объем эритроцита.

используемыми в современной гематологической практике.

Мы предлагаем оценивать отношение площадь/объем эритроцита по следующей формуле:

$$S/V = (\text{площадь поверхности эритроцита} + \text{площадь проекции эритроцита на плоскость}) / \text{объем эритроцита}, \quad (1)$$

где S — площадь поверхности эритроцита, V — объем эритроцита.

Принципиальными для правильной оценки отношения и других параметров (высота и диаметр) клетки являются два фактора: 1) точная калибровка АСМ перед ска-

нированием, 2) использование корректного метода фиксации. Согласно данным, полученным при сочетании Рамановской микроспектроскопии и АСМ, максимальную структурную целостность эритроцитов и сохранность гемоглобина обеспечивают два метода фиксации — фиксация глутаральдегидом и смесью формальдегида (3 %) и глутаральдегида (0.1 %). В последнем случае автофлуоресценция клеток минимальна (Asghari-Khiavi et al., 2010). Мы использовали фиксацию глутаральдегидом (2.5 %), обеспечивающую максимальную сохранность архитектоники эритроцита. Апробация метода количественной оценки основных параметров на эритроцитах здоровых доноров показала следующие результаты: высота клетки в зоне тора 1.70 ± 0.54 мкм, в зоне пеллора — 0.22 ± 0.16 мкм, диаметр клетки 8.56 ± 0.95 мкм, площадь всей поверхности клетки 105.59 ± 12.82 мкм², объем клетки 61.55 ± 9.13 мкм³, отношение площадь/объем составило 2.07 ± 0.34 (рис. 2; см. таблицу).

В контроле (инкубация в PBS без НЧМ, 60 мин, 37 °С) преобладающая форма эритроцитов — нормоциты. И метод СЭМ, и метод АСМ показывают однозначную классическую форму двояковогнутых дисков (рис. 2, 3). Метод РМА демонстрирует присутствие только органических элементов — углерода и кислорода (рис. 3, б). Однако даже такая непродолжительная инкубация в среде без глюкозы приводит к незначительной трансформации клеток: доля нормоцитов составляет 88.9 % от общего числа эритроцитов, эхиноцитов — 2.3, клеток других форм — 8.8 % (по результатам анализа архитектоники 100 клеток методом АСМ). Анализ эритроцитов методом СЭМ также выявляет абсолютное преобладание нормоцитов. В некоторых случаях у нормоцитов выявлена необычная «треугольная» форма пеллора. Поверхность всех клеток гладкая, мембрана четко контурирована.

При инкубации НЧМ с эритроцитами происходит агрегация НЧМ. Это проявляется в увеличении гидродинамического диаметра с 20 ± 4 до 37 ± 4 нм ($P < 0.05$). Феномен увеличения гидродинамического диаметра вследствие взаимодействия с белками сыворотки крови и формирования вокруг наночастиц так называемой белковой короны (из альбуминов, иммуноглобулинов, белков системы комплемента, аполипопротеина, трансферрина и гемоглобина) является установленным фактом (Duran et al., 2015). Однако в нашем исследовании инкубация НЧМ с сывороткой приводила лишь к незначительному увеличению диаметра до 28 ± 2 нм, тогда как изменение размеров НЧМ после инкубации с эритроцитами приводило к увеличению их гидродинамического диаметра. По всей вероятности, за формирование «белковой короны» в данном случае ответствен гемоглобин, который высвобождается из эритроцитов вследствие повреждения клеточных мембран. Поэтому для изоляции НЧМ от клеток крови и сохранения первоначальной степени их дисперсности необходимо использовать инертные покрытия либо заключать их в состав липосом.

Инкубация эритроцитов с НЧМ приводит к значительному изменению архитектоники клеток и повреждению мембран эритроцитов. Трансформацию эритроцитов оценивали согласно атласам Новицкого с соавторами (2003) и Козинца с соавторами (2004).

Методом СЭМ выявили следующие трансформированные формы эритроцитов после инкубации с НЧМ в конечной концентрации 0.18 мг/мл (37 °С, 60 мин): дакриоциты — эритроциты в виде капли слезы (рис. 4, а), сфероциты — эритроциты в форме сферы (рис. 4, б), сто-

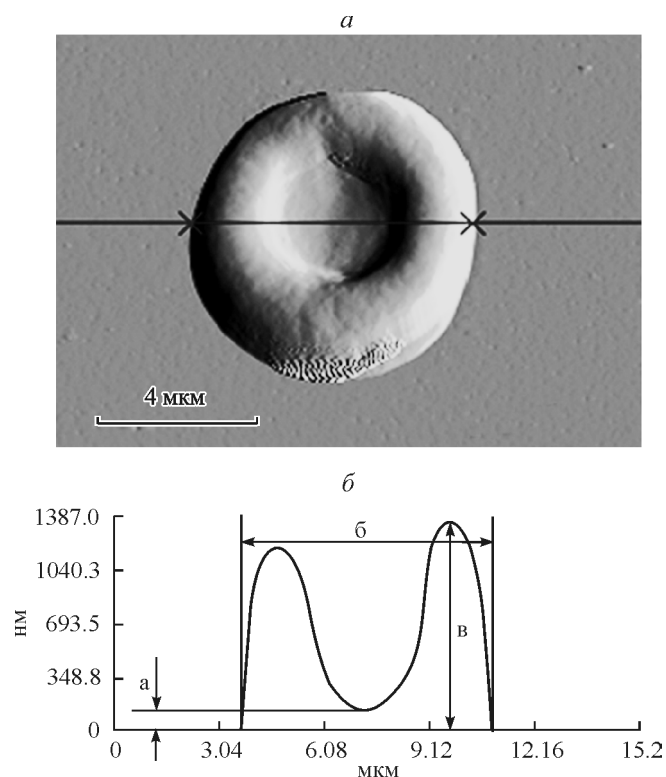


Рис. 2. Морфометрическая характеристика эритроцита (клетка получена методом АСМ).

а — архитектоника типичного нормоцита, б — боковой профиль клетки показывает принцип измерения основных параметров эритроцита: а — высота в зоне пеллора, б — диаметр эритроцита, в — высота в зоне тора.

**Основные морфологические параметры эритроцитов в контроле
и после взаимодействия с НЧМ (37 °С, 60 мин)**

Концентрация НЧМ, мг/мл	Диаметр эритроцита, мкм	Максимальная высота (в зоне тора), мкм	Минимальная высота (в зоне пеллора), мкм	Площадь поверхности эритроцита, мкм ²	Объем эритроцита, мкм ³	Отношение площадь/объем
Контроль	8.56 ± 0.95 (n = 82)	1.70 ± 0.54 (n = 76)	0.22 ± 0.16 (n = 53)	105.59 ± 12.82 (n = 41)	61.55 ± 9.13 (n = 34)	2.07 ± 0.34 (n = 47)
0.0018	7.58 ± 0.85 ^a (n = 122)	2.11 ± 0,50 ^a (n = 130)	0.62 ± 0.32 ^a (n = 56)	100.25 ± 18.92 ^a (n = 65)	53.65 ± 10.22 ^a (n = 68)	2.05 ± 0.20 (n = 42)
0.18	7.44 ± 0.99 ^a (n = 71)	1.90 ± 0.52 ^a (n = 76)	0.80 ± 0.44 ^a (n = 41)	99.77 ± 11.22 (n = 39)	52.38 ± 8.36 ^a (n = 60)	1.90 ± 0.25 ^a (n = 43)

Примечание. n — число экспериментов. ^a Различия с контролем статистически значимы ($P < 0.05$).

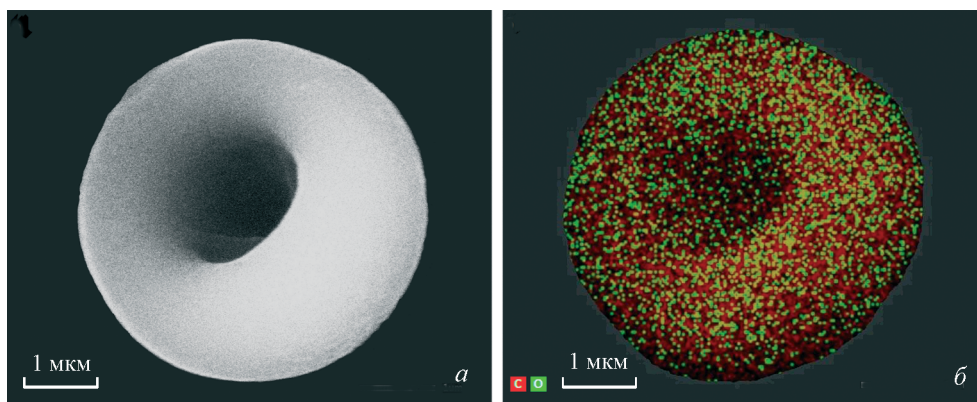


Рис. 3. Структурно-морфологическая характеристика эритроцита.

a — архитектура типовой нормоцита (клетка получена методом СЭМ), *б* — карта распределения углерода (красный) и кислорода (зеленый) в клетке (полученная методом РМА).

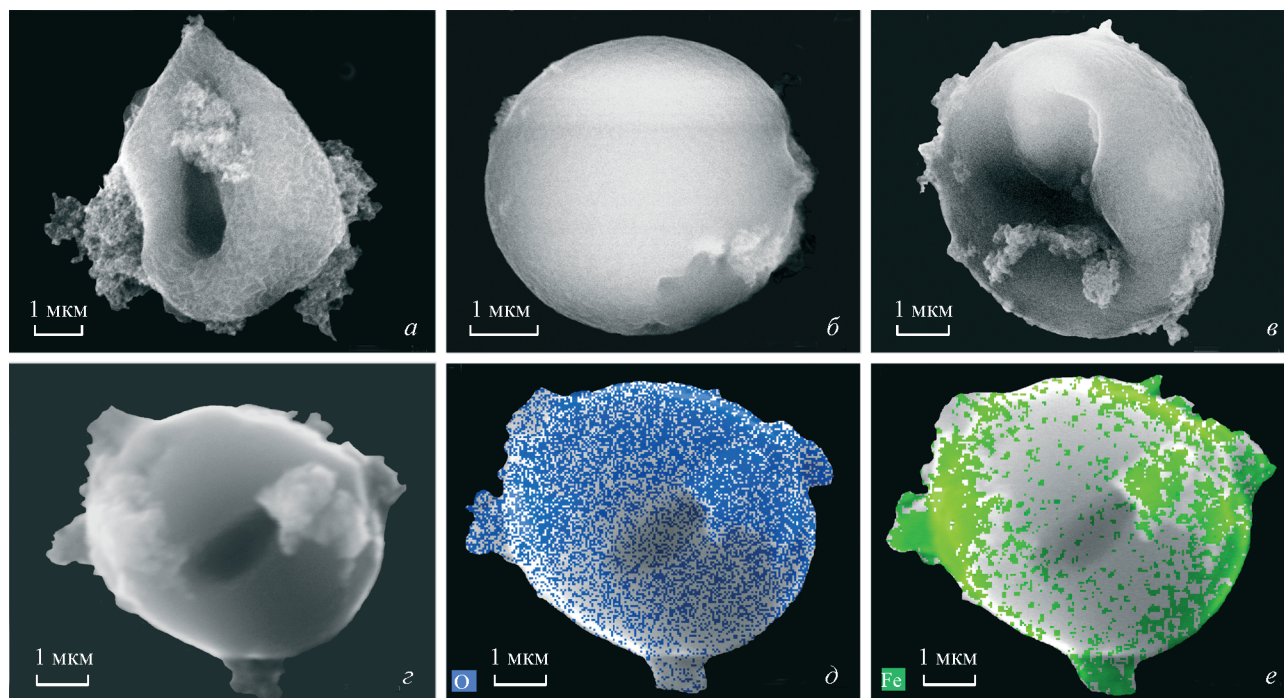


Рис. 4. Изображения эритроцитов, трансформированных под влиянием НЧМ, полученные методами СЭМ и РМА.

a — архитектура дакриоцита, *б* — архитектура сфероцита, *в* — архитектура кодоцита, *г* — архитектура стоматоцита (метод СЭМ), *д* — карта распределения кислорода (синий) в стоматоците, *е* — карта распределения железа (зеленый) в стоматоците (метод РМА; Ка-линии О и Fe). Совместная локализация сигналов от Fe и О в области видимых агрегатов доказывает то, что НЧМ напрямую связываются с мембраной стоматоцита.

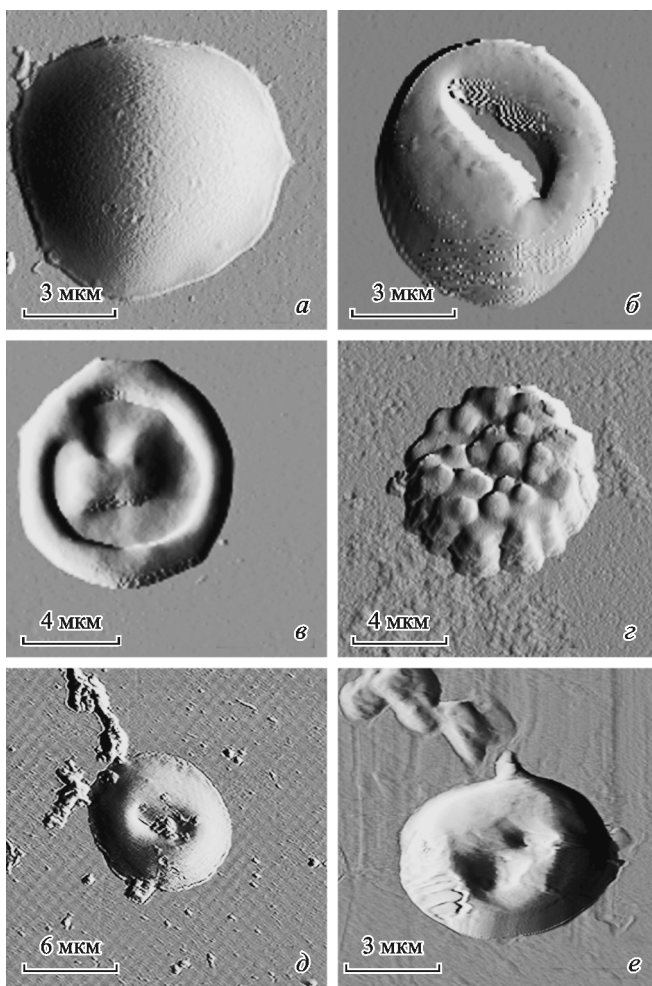


Рис. 5. Влияние НЧМ на структурно-морфологическую характеристику эритроцитов. Изображения получены методом АСМ.

a — архитектура сфероцита, *б* — архитектура стоматоцита, *в* — архитектура кодоцита, *г* — архитектура эхиноцита, *д* — наночастицы $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ связаны с мембраной эритроцита, *е* — повреждение мембраны кодоцита под воздействием наночастиц $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$.

матоциты — куполообразные клетки с углублением (рис. 4, *в*), кодоциты — эритроциты в форме колокола (рис. 4, *г*). Микроструктура мембран эритроцитов также оказывается существенно измененной: поверхность клеток неровная, «ячеистая», на отдельных участках клетки значительно деформированная. Очевидными фактами являются и прямое взаимодействие крупных агрегатов НЧМ с мембранами эритроцитов, и повреждения, возникающие вследствие этого взаимодействия. Данные РМА также прямо указывают на связывание крупных агрегатов НЧМ с эритроцитами: наблюдается колокализация сигналов от Fe и O в области видимых агрегатов (рис. 4, *д*, *е*).

Аналогичный результат, указывающий на трансформацию эритроцитов в процессе взаимодействия с НЧМ (0.0018 мг/мл, 37 °С, 60 мин), дает АСМ. Выявляются следующие трансформированные формы эритроцитов (рис. 5) — сфероциты (*a*), стоматоциты (*б*), кодоциты (*в*) и эхиноциты (*г*).

Как и в случае с СЭМ, наблюдали прямое связывание агрегатов НЧМ с мембранами эритроцитов (рис. 5, *д*), вследствие чего мембрана клеток оказывалась повреж-

денной (рис. 5, *е*). Отмечали появление «трещин» на поверхности мембраны, мембрана теряла гладкость и структурированность. Одним из вариантов альтерации, по всей видимости, является разрушение сialовой кислоты, поскольку она обуславливает отрицательный заряд мембран и предотвращает агрегацию эритроцитов. Проявлением этого факта является визуализация неоформленных крупных агрегатов клеток, формируемых эритроцитами после инкубации с НЧМ.

Выявлено также существенное смещение эритрограммы в сторону трансформированных форм. В частности, инкубация с НЧМ в конечной концентрации 0.0018 мг/мл дает следующую эритрограмму (в %): нормоциты — 51.4, сфероциты — 30.6, эхиноциты — 10, другие формы — 8 (по результатам АСМ-анализа архитектоники 100 клеток). Инкубация с НЧМ в конечной концентрации 0.18 мг/мл дает еще большее смещение эритрограммы в сторону предгемолитических форм, и подавляющее большинство красных клеток крови составляют сфероциты (в %): нормоциты — 9, сфероциты — 64, кодоциты — 19, другие формы — 8 (по результатам анализа архитектоники 100 клеток методом АСМ).

Результаты морфометрического анализа подтверждают смещение эритрограммы в сторону сфероцитоза, поскольку инкубация с НЧМ (обе концентрации) вызывает статистически значимое уменьшение диаметра на фоне увеличения высоты клеток ($P < 0.05$; см. таблицу). Кроме того, по всей вероятности, идет смещение в сторону микросфероцитоза, поскольку и площадь, и объем эритроцитов статистически значимо уменьшаются. Отношение площадь/объем уменьшается при возрастании концентрации НЧМ до 0.18 мг/мл, что говорит о затруднении реализации основной газотранспортной функции трансформированными эритроцитами.

Таким образом, предложенная методика определения отношения площадь/объем полностью коррелирует и с результатами других морфометрических измерений, и с морфологической оценкой изменений архитектоники эритроцитов под действием альтерирующих факторов.

Длительное нахождение в крови (60 мин и более) НЧМ даже в концентрациях, безвредных для нейтрофилов (Герман и др., 2013а, 2013б) приводит к выраженной альтерации эритроцитов. Это проявляется в изменении архитектоники, морфометрических параметров и микроструктуры мембран клеток, в сдвиге эритрограммы в сторону образования предгемолитических форм (преимущественно сфероцитов), в прямом повреждении мембран эритроцитов и изменении поверхностного заряда мембран, следствием чего является формирование неоформленных агрегатов клеток. Для предотвращения альтерации необходимо изолировать НЧМ от клеток крови, например заключая их в состав липосом (German et al., 2015), которые могут позволить: 1) сохранить степень дисперсности и однородность наночастиц; 2) предотвратить прямой контакт НЧМ с мембранами клеток крови и, таким образом, их альтерацию; 3) изменять физико-химические свойства наноматериалов, изменяя их с гидрофильных на гидрофобные.

Взаимодействие между эритроцитами и агрегатами НЧМ, вероятнее всего, носит неспецифический характер. Электростатическое связывание на начальном этапе исключено из-за отрицательного заряда на мембране эритроцита и отрицательного ζ -потенциала НЧМ (13.09 мВ). Гидрофильные (гидрофобные) взаимодействия также исключены, поскольку мембраны гидрофобны, тогда как

НЧМ — гидрофильны. Однако поскольку идет значительная агрегация НЧМ, можно представить следующую последовательность событий: крупные агрегаты НЧМ первоначально электростатически связываются с положительно заряженными тетраалкиламмониевыми группами лектина и сфингомиелина. При сближении агрегатов НЧМ с мембраной происходит разрушение сиаловых кислот со значительным снижением отрицательно заряженных карбоксильных групп, что приводит к упрочению контакта агрегатов НЧМ с мембраной эритроцитов и подключению к взаимодействию близкодействующих Ван-дер-Ваальсовых (в том числе Лондоновских) сил. Непосредственный контакт НЧМ с фосфолипидами клеточных мембран может приводить как к непосредственному разрушению ряда функциональных групп, так и опосредованно вызывать активацию процесса перекисного окисления липидов, в результате чего ригидность мембран начинает возрастать из-за преобладания насыщенных жирных кислот. Изменение физико-химических свойств мембран приводит к затруднению корректной работы ионных каналов (нельзя исключить и непосредственный контакт НЧМ с белками ионных каналов, вызывающий денатурацию последних) и как следствие — к ионному дисбалансу и образованию сфероцитов.

Таким образом, АСМ позволяет не только точно определить основные морфометрические параметры эритроцитов, но и оценить отношение площадь/объем эритроцита, являющееся одной из важных функциональных характеристик клетки. Длительная инкубация (60 мин) НЧМ с эритроцитами вызывает выраженную патологию (свойственную пойкилоцитозу и анизоцитозу), изменение заряда мембран эритроцитов и их деградацию.

Авторы выражают искреннюю признательность сотрудникам Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского Д. А. Горину и С. В. Герману за синтез и предоставление наночастиц магнетита. Работа частично выполнялась на оборудовании центра коллективного пользования научным оборудованием «Новые материалы и ресурсосберегающие технологии».

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 16-14-10179).

Список литературы

Боровская М. К., Кузнецова Э. Э., Горохова В. Г., Корякина Л. Б., Курильская Т. Е., Пивоваров Ю. И. 2010. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 3 (73) : 334—354. (Borovskaya M. K., Kuznetsova E. E., Gorokhova V. G., Koriakina L. B., Kuril'skaya T. E., Pivovarov Ju. I. 2010. Structural and functional characteristics of membrane's erythrocyte and its change at pathologies of various genesis. Bull. of the East Siberian Scientific Center SBRAMS. 3 (73) : 334—354.)

Герман С. В., Иноземцева О. А., Маркин А. В., Метвалли Х., Хомутов Г. Б., Горин Д. А. 2013а. Синтез гидрозолей магнетита в инертной атмосфере. Коллоидный журн. 75 (4) : 534. (German S. V., Inozemtseva O. A., Markin A. V., Metvally H., Khotimov G. B., Gorin D. A. 2013a. Synthesis of magnetite hydrosols in inert atmosphere. Colloid J. 75 (4) : 534.)

Герман С. В., Иноземцева О. А., Наволокин Н. А., Пудовкина Е. Е., Зувев В. В., Волкова Е. К., Бучарская А. Б., Плескова С. Н., Маслякова Г. Н., Горин Д. А. 2013б. Синтез гидрозо-

лей магнетита и их воздействие на живые системы на клеточном и тканевом уровнях. Российские нанотехнологии. 8 (7-8) : 128—133. (German S. V., Inozemtseva O. A., Navolokin N. A., Pudovkina E. E., Zuev V. V., Volkova E. K., Buchar'skaya A. B., Pleskova S. N., Maslyakova G. N., Gorin D. A. 2013b. Synthesis of magnetite hydrosols and assessment of their impact on living systems at the cellular and tissue levels using MRI and morphological investigation. Nanotechnologies in Russia. 8 (7-8) : 573—580.

Козинец Г. И., Шишканова З. Г., Сарычева Т. Г., Новодержкина Ю. К., Дягилева О. А., Проценко Д. Д. 2004. Клетки крови и костного мозга. Атлас. М.: Мед. информ. агентство. 203 с. (Kozinets G. I., Shishkanov Z. G., Sarycheva T. G., Novoderzhkina Yu. K., Diaghilev O. A., Protsenko D. D. 2004. Cells of blood and bone marrow. Atlas. Moscow: Med. News Agency. 203 p.)

Леонова В. Г. 1987. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека. Новосибирск: Наука. 241 с. (Leonova V. G. 1987. Analysis of erythrocyte populations in human ontogeny. Novosibirsk: Science. 241 p.)

Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Степанова Е. А., Быстрицкий Л. Д., Ткаченко С. Б. 2003. Атлас. Клинический патоморфоз эритроцита. Томск: Изд-во Томск. ун-та; М.: ГЭОТАР-МЕД. 208 с. (Novitsky V. V., Ryazantseva N. V., Stepanova E. A., Bystritsky L. D., Tkachenko S. B. 2003. The Atlas. Clinical pathomorphology of erythrocyte. Tomsk: Publ. House of Tomsk Univ.; Moscow: GEOTAR-MED. 208 p.)

Першина А. Г., Сазонов А. Э., Мильто И. В. 2008. Использование магнитных наночастиц в биомедицине. Бюл. сиб. мед. 2 : 70—78. (Pershina A. G., Sazonov A. E., Milto I. V. 2008. Application of magnetic nanoparticles in biomedicine. Bull. Sib. Med. 2 : 70—78.)

Плескова С. Н. 2011. Атомно-силовая микроскопия в биологических и медицинских исследованиях. Долгопрудный: Изд. дом Интеллект. 184 с. (Pleskova S. N. 2011. Atomic-force microscopy in biology and medicine. Dolgoprudny: Intellect. 184 p.)

Плескова С. Н., Пудовкина Е. Е., Михеева Э. Р., Горшкова Е. Н. 2013. Взаимодействие квантовых точек с эритроцитами крови здоровых доноров. Бюл. эксперим. биол. мед. 156 (9) : 362—366. (Pleskova S. N., Pudovkina E. E., Mikheeva E. R., Gorshkova E. N. 2013. Interactions of quantum dots with donor blood erythrocytes *in vitro*. Bull. Exp. Biol. Med. 156 (3) : 384—388.)

Скоркина М. Ю., Федорова М. З., Сладкова Е. А., Деркачев Р. В., Забиняков Н. А. 2010. Влияние наночастиц железа на дыхательную функцию крови. Ярослав. пед. вестн. 3 : 75—79. (Skorkina M. Yu., Fedorova M. Z., Sladkova E. A., Derkach R. V., Zabinyakov N. A. 2010. Effect of iron nanoparticles on the respiratory function of blood. Yaroslavl Pedagogical Bull. 3 : 75—79.)

Якушева Е. В., Мирошников С. А., Кван О. В. 2013. Оценка влияния наночастиц металлов на морфологические показатели периферической крови животных. Вестн. Оренбург. гос. ун-та. 12 (161) : 203—207. (Yakusheva E. V., Miroshnikov S. A., Kwan O. V. 2013. Estimation of influence metal nanoparticles on morphological parameters of peripheral blood of animals. Bull. of the OGU. 12 (161) : 203—207.)

Asghari-Khiavi M., Wood B. R., Mechler A., Bamberg K. R., Buckingham D. W., Cooke B. M., McNaughton D. 2010. Correlation of atomic force microscopy and Raman micro-spectroscopy to study the effects of *ex vivo* treatment procedures on human red blood cells. Analyst. 135 : 525—530.

Bulte J. W., Kraitchman D. L. 2004. Monitoring cell therapy using iron oxide MR contrast agents. Curr. Pharm. Biotechnol. 5 : 567—584.

Duran N., Silveira C. P., Duran M., Stéfani D., Martinez T. 2015. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. J. Nanobiotechnol. 13 : 1—17.

German S. V., Navolokin N. A., Kuznetsova N. R., Zuev V. V., Inozemtseva O. A., Anis'kov A. A., Volkova E. K., Buchar'skaya A. B., Maslyakova G. N., Fakhrullin R. F., Terentyuk G. S.,

Vodovozova E. L., Gorin D. A. 2015. Liposomes loaded with hydrophilic magnetite nanoparticles: preparation and application as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. 135 : 109—115.

Grancharov S. G., Zeng H., Sun S., Wang S. X., O'Brien S., Murray C. B., Kirtley J. R., Held G. A. 2005. Bio-functionalization of monodisperse magnetic nanoparticles and their use as biomolecular labels in a magnetic tunnel junction based sensor. *J. Phys. Chem. B*. 109 : 13 030—13 035.

Guo Q., Liu Y., Xu K., Ren K., Sun W. G. 2013. Mouse lymphatic endothelial cell targeted probes: anti-LYVE-1 antibody-based magnetic nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* 9 : 2273—2284.

Nasiri R., Hamzehalipour Almaki J., Idris A. B., Abdul Majid F. A., Nasiri M., Salouti M., Irfan M., Amini N., Marvi-

baigi M. 2016. *In vitro* evaluation of actively targetable superparamagnetic nanoparticles to the folate receptor positive cancer cells. *Materials Sci. Eng. C*. 69 : 1147—1158.

Neamtu J., Verga N. 2011. Magnetic nanoparticles for magneto-resonance imaging and targeted drug delivery. *Digest J. Nanomat. Biostruct.* 6 : 969—978.

O'Reilly M., McDonnell L., O'Mullane J. 2001. Quantification of red blood cells using atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*. 86 : 107—112.

Pankhurst Q. A., Connolly J., Jones S. K., Dobson J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Applied Physics*. 36 : 167—181.

Поступила 27 VII 2017

CHANGES IN THE ARCHITECTONICS AND THE MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF ERYTHROCYTES UNDER THE INFLUENCE OF MAGNETITE NANOPARTICLES

S. N. Pleskova,¹ * E. E. Gornostaeva,² R. N. Kryukov,¹ A. V. Boryakov,² S. Yu. Zubkov¹

¹Research and Education Center for «Physics of Solid State Nanostructures», N. I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, Nizhny Novgorod, 603950, and

² Center for Collective Use of Scientific Equipment «New Materials and Resource-Saving Technologies» of the Research Institute of Chemistry, N. I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, Nizhny Novgorod, 603950;

* e-mail: pleskova@mail.ru

A new high-precision technique for calculating the area / volume ratio of erythrocyte by atomic force microscopy method has been developed. The method is approved on erythrocytes of healthy donors. Scanning electron microscopy, atomic force microscopy and X-ray microanalysis revealed that magnetite nanoparticles are capable of interacting with erythrocyte membranes. The results of the interaction are poikilocytosis and anisocytosis. Incubation of magnetite nanoparticles with erythrocytes leads to aggregation of nanoparticles in a serum-free medium.

Key words: erythrocytes, area / volume ratio, magnetite nanoparticles, architectonics, atomic force microscopy, scanning electron microscopy, X-ray microanalysis.