

УДК 612.115:591.11:546.26

ОЦЕНКА ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДИСПЕРСИИ ШУНГИТОВОГО НАНОУГЛЕРОДА

А. Г. Борисова

Институт биологии КарНЦ РАН, ФИЦ «Карельский научный центр РАН», Петрозаводск, Россия

Графен и связанные с ним производные показали большой нанотехнологический потенциал, включая биомедицинские приложения, поэтому шунгитовый углерод, содержащий графеноподобные наноразмерные структуры, также вызывает интерес исследователей благодаря своим уникальным свойствам. Тщательное изучение свойств шунгитового нанокarbonа необходимо для понимания циркуляции наноматериала во внутренней среде организма и в окружающей среде. Шунгитовый углерод предлагается рассматривать как многоуровневую структуру, образованную графеноподобными фрагментами, близкими по свойствам к восстановленному оксиду графена. Проведено исследование влияния водной дисперсии наночастиц шунгитового углерода на клетки красной крови человека *in vitro*. Изучена осмотическая устойчивость эритроцитов человека в присутствии шунгитовых наночастиц при комнатной температуре, а также терморезистентность эритроцитов. Осморезистентность эритроцитов под действием частиц шунгитового коллоида в концентрации 4–15 мкг/мл незначительно снижалась, но оставалась в границах нормы. Шунгитовый углерод в концентрации 2,5–40 мкг/мл не индуцировал повреждение клеток крови человека в условиях термогемолиза. Сопоставление результатов по осмо- и терморезистентности эритроцитов позволяет заключить, что проявление гемолитической активности наночастиц водной дисперсии шунгитового углерода зависит от температуры среды и концентрации. Можно предположить, что в условиях опыта по термогемолизу адсорбция наночастиц шунгитового углерода на поверхности клеточной мембраны была недостаточной, чтобы вызвать существенные изменения цитоархитектоники клеток, либо состояние окисленности графеновых фрагментов таково, что не влекло за собой изменение проницаемости мембраны для ионов.

Ключевые слова: шунгит; наночастицы; гемолиз; термогемолиз; осморезистентность; мембрана клетки.

A. G. Borisova. AN ASSESSMENT OF THE RESISTANCE OF ERYTHROCYTES TO HEMOLYSIS UNDER THE EFFECT OF DISPERSED SHUNGITIC NANOCARBON

Graphene and the related derivatives have exhibited high potential for nanotechnology applications, including biomedicine, wherefore shungitic carbon, which contains graphene-like nanoscale structures, is also of interest for researchers due to its unique properties. The properties of shungitic nanocarbon need to be studied thoroughly to understand how this nanomaterial circulates inside the body and in its ambient environment. Shungitic carbon should arguably be regarded as a multi-tiered structure formed by graphene-like

fragments similar in properties to reduced graphene oxide. The effect of an aqueous dispersion of shungitic carbon nanoparticles on human red blood cells was studied *in vitro*. The osmotic resistance of human erythrocytes in the presence of shungite nanoparticles at room temperature, as well as the thermal resistance of erythrocytes were investigated. The osmotic resistance of red blood cells decreased slightly under the action of a 4.0–15 µg/ml colloidal solution of shungite particles, but remained within the normal range. The 2.5–40 µg/ml concentration of shungitic nanocarbon did not damage human blood cells during thermohemolysis. A comparison of the results on the osmotic and thermal resistance of red blood cells has led to the conclusion that the expression of the hemolytic activity of nanoparticles in an aqueous dispersion of shungitic carbon depends on the temperature of the medium and on concentration. In the given experiment on thermohemolysis, the adsorption of shungite carbon nanoparticles on cell membrane surface was probably insufficient to cause significant changes in the cell architectonic organization, or the oxidation state of graphene fragments was such that it did not entail a change in membrane permeability to ions.

Key words: shungite; nanoparticles; hemolysis; thermohemolysis; osmoresistance; cell membrane.

Введение

В последнее время все больший интерес исследователей вызывают биологические эффекты наночастиц углерода, а также механизмы их взаимодействия с биополимерами и биомембранами. Спектр биологической активности углеродных наноматериалов очень широк – от противоопухолевой, антивирусной и антимикробной до антиоксидантной, нейропротективной, фотодинамической и мембранотропной [Liu et al., 2013; Wang et al., 2016]. Широкое применение наноматериалов семейства графена, а к ним относится, по многим данным, и наноуглерод шунгита [Rozhkova et al., 2016], делают крайне вероятным их появление в окружающей среде в значительных количествах. Число биологических исследований графеновых наноматериалов очень быстро увеличивается в последние годы. В них показаны эффекты биологических взаимодействий между графеновыми материалами на различных уровнях организации живых систем, от биомолекул до целых организмов [Zhang et al., 2016; Ye et al., 2018]. Однако то, каким образом осуществляются эти эффекты, остается далеко не ясным. Очевидно, что для ответа на данный вопрос совершенно необходимы соответствующие исследования на уровне биологических молекул, а также клеточных мембран и целых клеток.

Уникальные свойства структуры шунгита могут использоваться для развития технологий в наномедицине, в т. ч. и для доставки лекарств. В основе шунгитового углерода выделяется ведущий структурный элемент – непланарные молекулы, близкие по свойствам к восстановленному оксиду графена. При весь-

ма широком использовании шунгитового материала в различных биологических приложениях (косметика, курортология, биодобавки, водяные фильтры) отсутствует понимание его взаимодействий с биомолекулами и клетками в физиологической среде. Данные об особенностях совместимости графена – как чистого, так и разной степени окисленности – с различными отделами внутренней среды организма носят фрагментарный и противоречивый характер [Liao et al., 2011; Zhang et al., 2011; Sasidharan et al., 2012]. К сожалению, недостаточно и информации, касающейся потенциальной опасности углеродных наноматериалов, а также их токсичности [Zhao et al., 2014].

Одним из базовых тестов для выявления взаимодействия наночастиц с эритроцитами является гемолиз (потеря целостности мембран эритроцитов, приводящая к утечке гемоглобина). Наночастицы могут повлиять на целостность мембраны эритроцитов в результате механического повреждения или действия активных форм кислорода (АФК). Кроме того, на гемолитические свойства наночастиц также могут влиять их размер, форма, поверхностный заряд и химический состав.

Так, в работе [Zhang et al., 2011] показано, что оксид графена индуцировал зависящий от дозы и от времени гемолиз эритроцитов мышей при 37 °С. При выдерживании суспензии эритроцитов с оксидом графена в концентрации 10–80 мкг/мл в течение 1 часа не было обнаружено разницы в степени гемолиза как между этими концентрациями, так и с контролем, но при удлинении времени экспозиции до 6 часов разница в степени гемолиза по сравнению с контролем была существенной – почти в 3 раза. В статье [Sasidharan et al., 2012] при-

ведены данные о том, что обработка эритроцитов человека чистым и окисленным графеном в течение 3 часов при комнатной температуре не приводила к гемолизу при концентрациях графена от 10 до 75 мкг/мл. Таким образом, и графен, и оксид графена проявляли в условиях опыта хорошую гемосовместимость.

В противоположность этому в работе [Liao et al., 2011] обнаружена высокая гемолитическая активность оксида графена в интервале концентраций 3–200 мкг/мл. При наименьшем размере окисленный графен показал наибольшую гемолитическую активность, тогда как агрегированные графеновые листы показали самую низкую гемолитическую активность, а покрытие оксида графена хитозаном ее практически исключило. Таким образом, эти результаты демонстрируют, что размер частиц, их морфология, состояние частиц и поверхностный заряд графена оказывают сильное влияние на биологические/токсикологические реакции по отношению к эритроцитам.

В экспериментах [Jaworski et al., 2017] с красными кровяными клетками куриных эмбрионов также обнаружена гемолитическая активность графена и его производных – инкубация с графеном, оксидом графена и восстановленным оксидом графена в концентрациях 50 мкг/мл и выше вызывала повреждение структуры эритроцитов и дозозависимый гемолиз. Результаты исследования показали, что различные формы графена, в зависимости от способа получения и модификации поверхности, имели различную гемосовместимость, гемолитическая активность росла в ряду оксид графена > восстановленный оксид графена > графен.

Таким образом, эти факторы должны быть тщательно изучены и рассмотрены перед применением шунгитовых дисперсий в медицинских и прочих целях, поскольку углерод шунгита, согласно структурной модели, строится из графеновых кластеров как промежуточных элементов. Важно контролировать физические и химические свойства получаемых водных коллоидов углеродных наночастиц, т. к. степень эксфолиации (отслаивания) частиц и их последующей агрегации зависит от времени обработки суспензии ультразвуком.

Ранее мы исследовали влияние наночастиц шунгитового углерода (ШУ) на эритроциты человека и ряда позвоночных *in vitro* различными методами. Было показано, что введение нанодисперсии ШУ в суспензию эритроцитов человека приводило к образованию агрегатов из дискоцитов [Горюнов и др., 2009]. Выявлено тромбогенное действие дисперсии ШУ на сис-

тему свертывания крови человека [Борисова, 2018].

Устойчивость эритроцитов к гемолизу определяется структурной организацией их мембраны и поэтому может быть использована для оценки функционального состояния клеток под влиянием химических соединений, потенциально способных вызывать изменение физических и химических свойств мембран и целых клеток.

Целью настоящей работы было выявление *in vitro* гемолитической активности наночастиц ШУ – их возможного воздействия на мембраны эритроцитов человека как в условиях осмотического стресса, так и при действии высоких температур.

Материалы и методы

Объектами исследования были эритроциты человека. Консервированную кровь здоровых доноров I(0) группы, отобранную в гемоконсервант «Глюгидир» (срок хранения 21 день), трижды отмывали в фосфатно-солевом буфере pH 7,4 для получения осадка эритроцитов, из которого готовили 1%-ю суспензию.

В экспериментах использованы стабильные водные дисперсии наночастиц ШУ, приготовленные из шунгитового горнорудного сырья Шуньга I согласно методике Н. Н. Рожковой [2011] и охарактеризованные с помощью спектрофотометрии UV-Vis, рамановского рассеяния и динамического рассеяния света с исходной концентрацией углерода 0,1 мг/мл. Шунгитовый углерод предлагается рассматривать как многоуровневую структуру, образованную графеноподобными фрагментами размером < 1 нм в качестве основных структурных элементов, агрегированных в стопки 1,5–2,5 нм, которые, в свою очередь, формируют глобулы ~ 6 нм. Ассоциаты глобул размером 20–100 нм завершают структуру углеродных наночастиц (НЧ) [Rozhkova et al., 2016].

На рис. 1 представлен спектр поглощения такой дисперсии.

Спектр имеет характерный вид с пиком поглощения при 256 нм, который обусловлен $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами в сопряженных связях. Сравнение со спектрами оксида графена и восстановленного оксида графена [Gurunathan et al., 2012; Choi et al., 2016] позволяет считать, что спектр характеризует образец с меньшей степенью окисления графеновых элементов ШУ, т. е. восстановленный оксид графена.

Отличие в состоянии окисления обусловлено различным количеством гидроксильных, карбоксильных и эпоксидных групп по краям

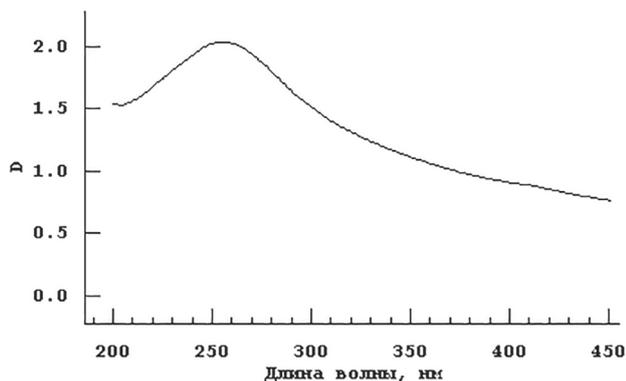


Рис. 1. Спектр поглощения дисперсии ШУ после центрифугирования при 10000 об/мин, обработанного ультразвуком в течение 5 минут, концентрация 0,1 мг/мл

Fig. 1. The absorption spectrum of the dispersion ShC after centrifugation at 10,000 rpm, treated with ultrasound for 5 minutes, the concentration of 0.1 mg/ml

и на плоскости графеновых элементов. Восстановленный оксид графена имеет кислородсодержащие группы только по краям. Более высокая степень окисления наночастиц графена означает и более высокую гидрофильность их поверхности.

Для исследования влияния наночастиц ШУ на состояние клеточной мембраны мы выдерживали эритроциты человека *in vitro* с дисперсиями шунгитового нанокремнезема с исходной концентрацией 0,1 мг/мл, варьируя условия и время воздействия.

Для оценки осморезистентности количественно определяли степень гемолиза эритроцитов в гипотонических растворах NaCl [Лабораторные..., 1987]. Готовили солевые растворы со снижающейся концентрацией – 0,85; 0,80; 0,75; 0,70; 0,65; 0,60; 0,55; 0,50; 0,45; 0,40; 0,35; 0,30; 0,25; 0,20; 0,15; 0,10 %. В пробирки добавляли взвесь эритроцитов и оставляли при комнатной температуре на 30 минут, затем на спектрофотометре СФ-56 определяли поглощение раствора при 540 нм (поглощение гемоглобина), которое было пропорционально количеству выделившегося гемоглобина. Строили кривые гемолиза, из которых определяли C_{50} – концентрацию NaCl, при которой лизировало 50 % клеток. Эта величина является характеристикой осморезистентности эритроцитов. Исследовано 9 образцов донорской крови, для каждого строились кривые гемолиза по 14–16 концентрациям NaCl, повторность в пределах каждого образца составляла 3. В таблице приведены средние арифметические значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий определяли с помощью дисперсионного анализа по Краскелу – Уоллису.

Термогемолиз эритроцитов изучали модифицированным нами равновесным методом [Ямайкина, Черницкий, 1989]. Суспензию клеток, находящуюся в фосфатно-солевом буфере, инкубировали при 56 °С в течение времени t ; гемолиз оценивали спектрофотометрически по выходу гемоглобина в среду при 540 нм. По данным о степени гемолиза строили кинетические кривые, из которых вычисляли среднюю константу скорости реакции $k_{50} = 1/\tau_{50}$ (мин⁻¹), где τ_{50} – время лизиса 50 % клеток в суспензии.

Исследовано 16 образцов крови, эксперименты при каждой температуре выполнялись в 3-кратной повторности. Проведен дисперсионный анализ результатов по Краскелу – Уоллису.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты и обсуждение

Влияние наночастиц углерода на осморезистентность мембраны эритроцита

Анализировали изменение осморезистентности эритроцитов под действием шунгитового коллоида (ШК), результаты для концентрации ШК 2,5 мкг/мл проиллюстрированы на рис. 2.

Снижение концентрации NaCl, при которой лизировало 50 % клеток (C_{50}), свидетельствует о повышении осмотической резистентности эритроцитов, т. е. устойчивости клеток к различным воздействиям. Ослабление осмотической резистентности эритроцитов происходит

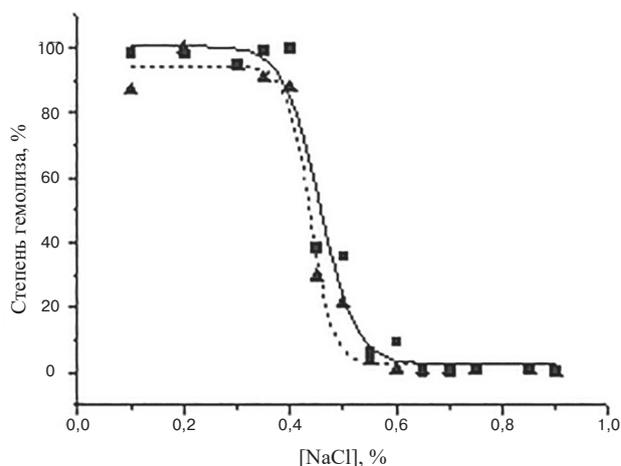


Рис. 2. Гемолиз эритроцитов человека в гипотонической среде, ■ – К, ▲ – 2,5 мкг/мл ШК ($t_{комн}$)

Fig. 2. Hemolysis of human erythrocytes in a hypotonic medium, ■ – K, ▲ – 2.5 µg/ml ShC (t_{room})

Величина осмотичности, соответствующая гемолизу 50 % клеток (C_{50}) после 30-минутной экспозиции при комнатной температуре

The magnitude of osmolality corresponding to hemolysis of 50 % of cells (C_{50}) after 30 minutes of exposure at room temperature

Концентрация НЧ, мкг/мл Concentration of NP, µg/ml	C_{50} , % NaCl, контроль control	C_{50} , % NaCl, опыт experiment
2,5	0,465 ± 0,022	0,422 ± 0,020
4	0,423 ± 0,020	0,452 ± 0,022
8	0,467 ± 0,025	0,474 ± 0,025
15	0,437 ± 0,020	0,460 ± 0,025

Примечание. Статистика по Краскелу – Уоллису $H = 11,076$, $p = 0,011$.

Note. Statistics according to the Kruskal – Wallis test $H = 11,076$, $p = 0.011$.

вследствие нарушения структурных и функциональных свойств их мембран.

Из анализа зависимостей, аналогичных представленным на рис. 2, получены данные по осморезистентности при различных концентрациях ШК (табл.).

Результаты дисперсионного анализа приведенных данных по Краскелу – Уоллису $H = 11,076$, $p = 0,011$ свидетельствуют о том, что выявлено достоверное влияние НЧ шунгитового углерода на осморезистентность эритроцитов. Таким образом, можно сделать вывод, что экспозиция красных клеток крови с наночастицами ШУ в концентрациях 4–15 мкг/мл приводила к уменьшению осмотической устойчивости эритроцитов, но абсолютные величины этого изменения были незначительны, т. е. не выходили за пределы нормы [Лабораторные..., 1987].

Снижение осмотической устойчивости эритроцитов может быть связано с некоторым снижением доли дискоцитов и ростом количества измененных форм эритроцитов, которые обладают наименьшей осмотической стойкостью. Ранее мы исследовали влияние нанодисперсий шунгитового углерода на морфологию и агрегацию эритроцитов человека [Горюнов и др., 2009]. Было установлено, что после инкубации с ШУ в концентрациях 3 мкг/мл в течение 30 мин при комнатной температуре изменений в соотношении форм клеток (дискоцитов, эхиноцитов, стоматоцитов) не наблюдалось, что согласуется с отсутствием гемолитической активности наночастиц при этих концентрациях.

Влияние наночастиц углерода на процесс термогемолиза эритроцитов

Общий вид кинетической кривой термогемолиза эритроцитов представлен на рис. 3.

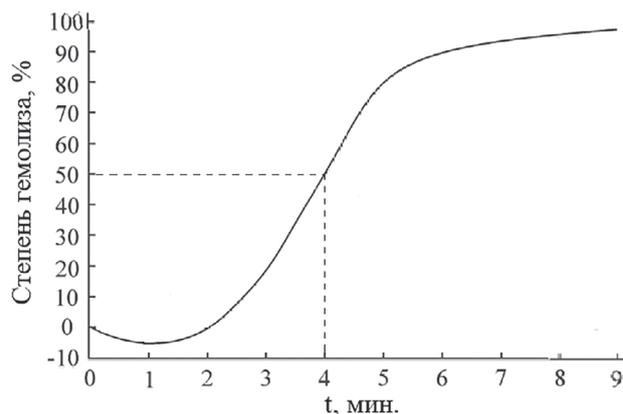


Рис. 3. Интегральная кривая термогемолиза эритроцитов. Пунктиром отмечено время 50% гемолиза (τ_{50})

Fig. 3. The integral curve of thermohemolysis of red blood cells. Dotted line shows the time of 50% hemolysis (τ_{50})

На S-образной кривой можно выделить начальную фазу (фазу сферуляции), прямолинейный участок, где скорость гемолиза максимальна, и конечную фазу гемолиза.

На рис. 4 показаны кинетические зависимости термогемолиза эритроцитов человека при 56 °С, на которых видно, что в присутствии 5 мкг/мл НЧ шунгитового углерода гемолиз проходит медленнее.

Аналогичные кривые были получены для различных концентраций шунгитового коллоида, из значений времени лизиса 50 % клеток τ_{50} рассчитывали константу скорости процесса гемолиза k_{50} ; результаты объединены на рис. 5. Поскольку в эксперименте использованы раз-

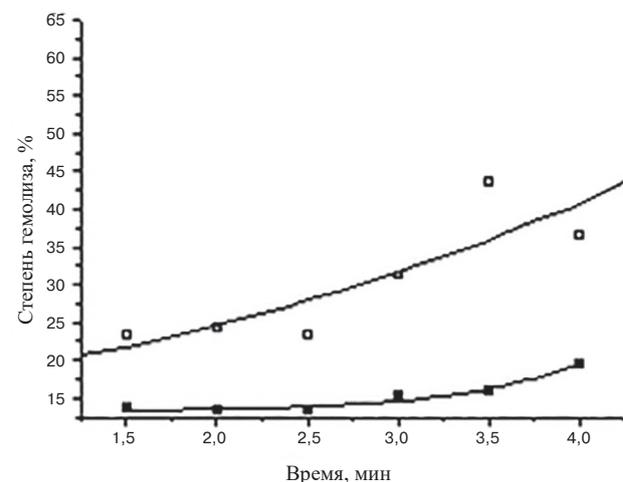


Рис. 4. Кинетические кривые гемолиза эритроцитов человека при 56 °С в присутствии наночастиц углерода: ■ – контроль, □ – 5 мкг/мл ШК

Fig. 4. Kinetic curves of human erythrocyte hemolysis at 56 °C in the presence of carbon nanoparticles: ■ – control, □ – 5 µg/ml ShC

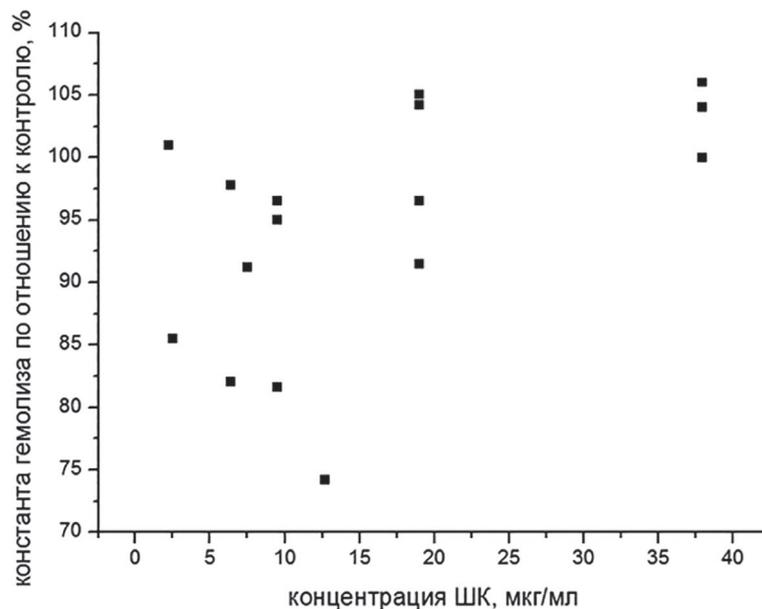


Рис. 5. Значения констант скорости термогемолиза эритроцитов человека при 56 °С, рассчитанных по отношению к контрольным значениям (без ШК), % (критерий Краскела – Уоллиса $H = 16,28$, $p = 0,297$)

Fig. 5. The values of the rate constants of thermohemolysis of human erythrocytes at 56 °C, calculated in relation to the control values (without ShC), % (test-statistic $H = 16.28$, P-Value = 0.297)

ные образцы крови, разброс данных достаточно велик, показатели интегральных средних значений по всем опытам не позволяют увидеть истинную картину, поэтому на рисунке по оси ординат представлены значения величины константы скорости гемолиза в процентах по отношению к контролю в каждом эксперименте.

На рис. 5 видно, что в исследованном интервале концентраций частиц ШУ – от 2,5 до 40 мкг/мл – наблюдается большой разброс в соотношении констант термогемолиза контрольных и опытных образцов, что не позволяет сделать однозначный вывод о влиянии НЧ шунгитового углерода на устойчивость клеток. Данные дисперсионного анализа по Краскелу – Уоллису $H = 16,28$ и $p = 0,297$ свидетельствуют о том, что статистически значимых различий между группами нет, т. е. влияния дисперсии наночастиц шунгитового углерода на резистентность эритроцитов к высокой температуре в исследованном интервале концентраций не обнаружено.

Это согласуется с данными статьи [Jaworski et al., 2017], где обнаружена гемолитическая активность графена и его производных лишь при концентрациях 50 мкг/мл и выше, а также с результатами экспериментов с чистым и окисленным графеном, в которых не наблюдался гемолиз эритроцитов после обработки их

наночастицами в концентрациях 10–75 мкг/мл в течение 3 часов при комнатной температуре [Sasidharan et al., 2012].

Исследуемая нами дисперсия шунгитового углерода является уникальной как по способу приготовления, так и по составу, поэтому целью исследования была гемосовместимость НЧ шунгитового углерода. Выше отмечалось, что данные о гемосовместимости графена и его производных носят противоречивый характер [Liao et al., 2011; Zhang et al., 2011; Sasidharan et al., 2012] и в значительной степени зависят от концентрации наночастиц. Поскольку водная дисперсия шунгитового углерода содержит частицы различных размеров, вплоть до долей микрона, необходимо продолжить исследования с большими концентрациями НЧ для оценки их влияния на систему крови.

В эксперименте также обнаружено, что ШК в концентрациях 0,1–20 мкг/мл не влиял на устойчивость красных клеток крови как на холоде (4–6 °С), так и при температуре тела (37 °С).

Важно отметить, что манипуляции, проводимые с дисперсией шунгитового наноуглерода, могут в различной степени влиять на ее состав, а именно на размер и количество частиц. С одной стороны, обработка ультразвуком приводит к отщеплению слоев графена, т. е. к уве-

личению числа частиц в дисперсии при одной и той же общей концентрации углерода. С другой стороны, центрифугирование дисперсии может вызывать слипание этих слоев, т. е. агрегацию в более крупные глобулы, которые отличаются по своим физико-химическим свойствам. Большой разброс значений констант гемолиза при одних и тех же концентрациях углерода в дисперсии дает основания утверждать, что важно контролировать физические и химические свойства дисперсии частиц наночуглерода, которые в большой степени зависят от способа ее приготовления, т. к. на степень отслаивания и размеры образующихся наночастиц влияют в том числе время обработки ультразвуком и мощность аппарата.

Ранее мы установили, что углеродные наночастицы способны значительно модифицировать состояние мембраны эритроцитов, что приводило к агрегации клеток в суспензии [Горюнов и др., 2009]. Проявление этого действия зависело от концентрации наночастиц и температуры, при которой инкубируются клетки. Экспозиция эритроцитов с шунгитовым наночуглеродом в концентрации 50 мкг/мл при 47 °С приводила к заметному увеличению эхиноцитов, дискоцитов со множественными выростами и ребристых форм, что, как мы предполагаем, связано с образованием комплексов наночастиц углерода с белками мембраны эритроцитов. Похожие результаты описаны в работе [Jaworski et al., 2017], выполненной на эритроцитах куриных эмбрионов, – инкубация с графеном, оксидом графена и восстановленным оксидом графена в концентрациях 50 мкг/мл и выше приводила к структурному повреждению клеточных мембран и образованию стоматоцитов и эхиноцитов.

Адсорбция наночастиц углерода на поверхности липидного бислоя клеточной мембраны также может повлечь за собой как изменение проницаемости мембраны для ионов, так и изменение цитоархитектоники клетки; и то, и другое сильно влияет на жизнеспособность клетки и на ее резистентность.

Заключение

Проведенные исследования показали, что устойчивость эритроцитов человека к высокотемпературному гемолизу (56 °С) в присутствии ШУ в концентрациях 2,5–40 мкг/мл достоверно не менялась. Данные о действии ШУ на термогемолиз не коррелируют с результатами наших экспериментов по осморезистентности – наночуглерод в концентрациях от 4 до 15 мкг/мл влиял на прочность мембраны

в условиях гипотонического стресса (незначительно снижал).

Очевидно, даже очень низкие концентрации наночастиц ШУ в суспензии влияют на состояние мембраны эритроцита, хотя их эффекты различаются. Известно, что особенность наночастиц состоит в их сильно развитой поверхности, вследствие чего поверхностные свойства систем, состоящих из подобных структур, могут преобладать над остальными, поэтому мы предполагали, что исследованные нами шунгитовые коллоидные растворы при определенных концентрациях могут проявлять свойства поверхностно-активных веществ, т. е. усиливать гемолиз клеток. В выбранном нами диапазоне концентраций углеродных наночастиц такой эффект при высокой температуре не наблюдался, что, возможно, связано с агрегацией наночастиц в этих условиях и изменением их поверхностных свойств. Другим возможным механизмом индуцирования гемолиза может быть генерация АФК наночастицами в результате их взаимодействия с эритроцитами и, как следствие, повреждение мембраны в результате окислительного стресса. Такого рода активность шунгитового наночуглерода зависит от степени окисленности графеновых фрагментов и требует дальнейшего изучения.

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (0218-2019-0082).

Литература

- Борисова А. Г. Тромбогенность углеродных наночастиц шунгита *in vitro* // Труды КарНЦ РАН. 2018. № 6. С. 109–114. doi: 10.17076/eb728
- Горюнов А. С., Борисова А. Г., Рожков С. П., Суханова Г. А., Рожкова Н. Н. Морфология и агрегация эритроцитов в нанодисперсиях углерода // Труды КарНЦ РАН. 2009. № 3. С. 30–37.
- Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 368 с.
- Рожкова Н. Н. Наночуглерод шунгитов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 100 с.
- Ямайкина И. В., Черницкий Е. А. Денатурация гемоглобина – первая стадия термогемолиза эритроцитов // Биофизика. 1989. Т. 34. С. 656–659.
- Choi Y.-J., Kim E., J. Han J., Kim J. H., Gurunathan S. A Novel biomolecule-mediated reduction of graphene oxide: A Multifunctional anti-cancer agent // *Molecules*. 2016. Vol. 21. P. 375. doi: 10.3390/molecules21030375
- Gurunathan S., Han J. W., Dayem A. A., Eppakayala V., Kim J. H. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide

in *Pseudomonas aeruginosa* // Int. J. Nanomed. 2012. Vol. 7. P. 5901–5914. doi: 10.2147/IJN.S37397

Jaworski S., Hinzmann M., Sawosz E., Grodzik M., Kutwin M., Wierzbicki M., Strojny B., Vadalasetty K. P., Lipińska L., Chwalibog A. Interaction of different forms of graphene with chicken embryo red blood cells // Environ. Sci. Pollut. Res. 2017. Vol. 24. P. 21671–21679. doi: 10.1007/s11356-017-9788-5

Liao K.-H., Lin Y.-S., Macosko C. W., Haynes C. L. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2011. P. 3, no. 7. P. 2607–2615. doi: 10.1021/am200428v

Liu J., Cui L., Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications // Acta Biomater. 2013. Vol. 9. P. 9243–9257.

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Natural grapheme-based shungite nanocarbon <http://elibrary.ru/item.asp?id=25397193> // Carbon nanomaterials sourcebook: graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamonds / Ed. K. D. Slatter. Boca Raton; London; New York: CRC press inc. (Taylor and Francis group), 2016. Vol. 1. P. 153–178.

Sasidharan A., Panchakarla L. S., Sadanandan A. R., Ashokan A., Chandran P., Girish C. M., Menon D., Nair S. V., Rao C. N., Koyakutty M. Hemocompatibility and macrophage response of pristine and functionalized

graphene // Small. 2012. Vol. 8. P. 1251–1263. doi: 10.1002/smll.201102393

Ye N., Wang Z., Wang S., Peijnenburg W. J. G. M. Toxicity of mixtures of zinc oxide and graphene oxide nanoparticles to aquatic organisms of different trophic level: particles outperform dissolved ions // Nanotoxicology. 2018. Vol. 2, no. 5. P. 423–438. doi: 10.1080/17435390.2018.1458342

Wang Z., Zhu W., Qiu Y. Biological and environmental interactions of emerging two-dimensional nanomaterials // Chem. Soc. Rev. 2016. Vol. 45(6). P. 1750–1780.

Zhang B., Wei P., Zhou Z., Wei T. Interactions of graphene with mammalian cells: Molecular mechanisms and biomedical insights // Adv. Drug Deliver. Rev. 2016. Vol. 105, part B. P. 145–162. doi: 10.1016/j.addr.2016.08.009

Zhang X., Yin J., Peng C., Hu W., Zhu Z., Li W., Fan C., Huang Q. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration // Carbon. 2011. Vol. 49. P. 986–995. doi: 10.1016/j.carbon.2010.11.005

Zhao J., Wang Z., White J. C. Graphene in the aquatic environment: adsorption, dispersion, toxicity and transformation // Environ. Sci. Technol. 2014. Vol. 48, no. 17. P. 9995–10009.

Поступила в редакцию 30.05.2019

References

Borisova A. G. Trombogenicnost' uglerodnykh nanochastits shungita *in vitro* [Thrombogenicity of carbon nanoparticles of shungite *in vitro*]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2018. No. 6. P. 109–114. doi: 10.17076/eb728

Goryunov A. S., Borisova A. G., Rozhkov S. P., Sukhanova G. A., Rozhkova N. N. Morfologiya i agregatsiya eritrotsitov v nanodispersiyakh ugleroda [Morphology and aggregation of erythrocytes in carbon nanodispersions]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2009. No. 3. P. 30–37.

Laboratornye metody issledovaniya v klinike [Laboratory methods of investigations in a clinic]. Ed. V. V. Men'shikova. Moscow: Meditsina, 1987. 368 p.

Rozhkova N. N. Nanouglerod shungitov [The nanocarbon of shungites]. Petrozavodsk: KarRC RAS, 2011. 100 p.

Yamaikina I. V., Chernitskii E. A. Denaturatsiya gemoglobina – pervaya stadiya termogemoliza eritrotsitov [Hemoglobin denaturation – the first stage of erythrocyte thermohemolysis]. *Biophysika* [Biophysics]. 1989. Vol. 34. P. 656–659.

Choi Y.-J., Kim E., J. Han J., Kim J. H., Gurunathan S. A Novel biomolecule-mediated reduction of graphene oxide: A Multifunctional anti-cancer agent. *Molecules*. 2016. Vol. 21. P. 375. doi: 10.3390/molecules21030375

Gurunathan S., Han J. W., Dayem A. A. Eppakayala V., Kim J. H. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomed.* 2012. Vol. 7. P. 5901–5914. doi: 10.2147/IJN.S37397

Jaworski S., Hinzmann M., Sawosz E., Grodzik M., Kutwin M., Wierzbicki M., Strojny B., Vadalasetty K. P.,

Lipińska L., Chwalibog A. Interaction of different forms of graphene with chicken embryo red blood cells. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017. Vol. 24. P. 21671–21679. doi: 10.1007/s11356-017-9788-5

Liao K.-H., Lin Y.-S., Macosko C. W., Haynes C. L. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2011. P. 3, no. 7. P. 2607–2615. doi: 10.1021/am200428v

Liu J., Cui L., Losic D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomater.* 2013. Vol. 9. P. 9243–9257.

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Natural grapheme-based shungite nanocarbon. *Carbon nanomaterials sourcebook: graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamonds*. Ed. K. D. Slatter. Boca Raton; London; New York: CRC press inc. (Taylor and Francis group), 2016. Vol. 1. P. 153–178.

Sasidharan A., Panchakarla L. S., Sadanandan A. R., Ashokan A., Chandran P., Girish C. M., Menon D., Nair S. V., Rao C. N., Koyakutty M. Hemocompatibility and macrophage response of pristine and functionalized graphene. *Small.* 2012. Vol. 8. P. 1251–1263. doi: 10.1002/smll.201102393

Ye N., Wang Z., Wang S., Peijnenburg W. J. G. M. Toxicity of mixtures of zinc oxide and graphene oxide nanoparticles to aquatic organisms of different trophic level: particles outperform dissolved ions. *Nanotoxicology.* 2018. Vol. 2, no. 5. P. 423–438. doi: 10.1080/17435390.2018.1458342

Wang Z., Zhu W., Qiu Y. Biological and environmental interactions of emerging two-dimensional nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 2016. Vol. 45(6). P. 1750–1780.

Zhang B., Wei P., Zhou Z., Wei T. Interactions of graphene with mammalian cells: Molecular mechanisms and biomedical insights. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2016. Vol. 105, part B. P. 145–162. doi: 10.1016/j.addr.2016.08.009

Zhang X., Yin J., Peng C., Hu W., Zhu Z., Li W., Fan C., Huang Q. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous ad-

ministration. *Carbon.* 2011. Vol. 49. P. 986–995. doi: 10.1016/j.carbon.2010.11.005

Zhao J., Wang Z., White J. C. Graphene in the aquatic environment: adsorption, dispersion, toxicity and transformation. *Environ. Sci. Technol.* 2014. Vol. 48, no. 17. P. 9995–10009.

Received May 30, 2019

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ:

Борисова Александра Григорьевна

старший научный сотрудник, к. б. н.
Институт биологии КарНЦ РАН,
ФИЦ «Карельский научный центр РАН»
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, Республика
Карелия, Россия, 185910
эл. почта: borisova@krc.karelia.ru
тел.: (8142) 765264

CONTRIBUTOR:

Borisova, Alexandra

Institute of Biology, Karelian Research Centre,
Russian Academy of Sciences
11 Pushkinskaya St., 185910 Petrozavodsk, Karelia, Russia
e-mail: borisova@krc.karelia.ru
tel.: (8142) 765264