

УДК 612.115:591.11:546.26

## ТРОМБОГЕННОСТЬ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ ШУНГИТА *IN VITRO*

**А. Г. Борисова**

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

При проникновении наночастиц в живой организм велика вероятность их появления в кровотоке, в связи с чем возникает вопрос о гемосовместимости различных наноматериалов. Изучено влияние углеродных наночастиц (шунгитового углерода и наноалмазов) на систему свертывания крови человека и норки *in vitro*. Время свертывания плазмы в результате реакции рекальцификации использовалось в качестве исследуемого параметра для оценки состояния внутренних путей активации системы свертывания. Показано, что влияние шунгитового углерода в концентрации от 3 до 6 мкг/мл на активность свертывающей системы человека проявлялось в существенном снижении времени рекальцификации. В случае добавления углеродных наночастиц к плазме норки значительное уменьшение времени рекальцификации наблюдалось начиная с концентрации 6 мкг/мл. В присутствии 9 мкг/мл наноалмазов сгусток образовывался заметно быстрее, чем в контроле. Мы предполагаем, что гиперкоагуляция в присутствии шунгитового углерода и наноалмазов может быть связана с более быстрой полимеризацией фибрина. Возможно, это следствие взаимодействия фибрина с наночастицами шунгитового углерода и наноалмазами, которые могут таким образом индуцировать активацию тромбоцитов и/или их агрегацию. Обсуждается молекулярный механизм выявленной тромбогенности углеродных наночастиц.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** наноматериалы; шунгитовый углерод; наноалмазы; свертываемость крови; белки.

### **A. G. Borisova. THROMBOGENICITY OF SHUNGITE CARBON NANOPARTICLES *IN VITRO***

When nanoparticles enter a living organism, it is very likely they will appear in the bloodstream, which raises the question of the hemocompatibility of various nanomaterials. The effect of carbon nanoparticles (shungite nanocarbon and nanodiamonds) on the human and mink blood coagulation system *in vitro* was studied. The time of plasma clotting triggered by recalcification was used as a test parameter for assessing the state of the internal coagulation system activation pathways. The effect of shungite nanocarbon at 3 to 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentrations on the activity of the human coagulation system manifest itself in a significant decrease in the recalcification time. When carbon nanoparticles were added to the mink plasma, a significant decrease in the recalcification time was observed starting at a concentration of 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The presence of nanodiamonds in the 9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration significantly accelerated the formation of a human plasma clot. We suppose that hypercoagulation in the presence of shungite carbon and nanodiamonds can be associated with a faster fibrin polymerization. This may be a result of fibrin interaction with shungite carbon nanoparticles and nanodiamonds, which can thus induce platelet activation

and/or aggregation. The molecular mechanism behind the revealed thrombogenicity of carbon nanoparticles is discussed.

**Key words:** nanomaterials; shungite carbon; nanodiamonds; blood clotting ability; proteins.

## Введение

Быстрое развитие нанотехнологий постоянно повышает вероятность контакта живых организмов с вновь разработанными наноматериалами, которые проявляют при этом разного рода биологическую активность. Хотя современные представления о токсичности углеродных наночастиц (УНЧ) совершенно недостаточны для оценки биомедицинских и экологических рисков, имеющиеся результаты указывают на возможное повреждающее воздействие при проникновении наночастиц в организм, отдельные органы и системы, ткани, клетки. В случае попадания в кровоток наночастицы (НЧ) могут контактировать как с белками крови, так и с форменными элементами, влияя тем самым на систему гемостаза. Показано, что отрицательно заряженные латексные частицы и квантовые точки CdSe/ZnS активируют внешний путь свертывания крови, приводящий к образованию фибрина [Miyamoto et al., 1990; Geys et al., 2008]. Латексные и полистирольные наночастицы с положительным зарядом поверхности также обладают тромбогенностью, однако, предположительно, за счет активации тромбоцитов, т. е. путем активации внутреннего пути свертывания крови [Miyamoto et al., 1990]. Установлено также, что частицы полистирола с отрицательным зарядом и гидродинамическим диаметром более 60 нм вызывают более слабую активацию тромбоцитов, чем такие же частицы меньшего размера [Mayer et al., 2009]. Уменьшение поверхностного заряда наночастиц покрытием их полиэтиленгликолем уменьшало агрегацию и активацию тромбоцитов [Kozłara et al., 2005]. Сопоставление действия влияния фуллерена C<sub>60</sub>CS (водорастворимого производного фуллерена), одностенных (SWCT) и многостенных (MWNT) углеродных нанотрубок на систему свертывания крови указывает на то, что нанотрубки стимулировали агрегацию тромбоцитов (SWNT > MWNT), в то время как для наносфер (фуллерен) такие эффекты не были отмечены [Radomski et al., 2005], что, скорее всего, связано с формой УНЧ.

Среди природных углеродных наноматериалов большой интерес вызывает углерод шунгитовых пород и его нанодисперсии. С теоре-

тической точки зрения это обусловлено тем, что в последние годы появилось большое количество свидетельств его принадлежности к графеновому семейству [Шека, Рожкова, 2016]. С практической точки зрения интерес определяется тем, что шунгит активно используется в различных косметических (мази, кремы, гели и др.), курортологических целях, в качестве биодобавок, в фильтрах для очистки воды. Такое применение пока не имеет достаточного научного обоснования, хотя требует глубокого понимания взаимодействий наноструктур с биомолекулами и клетками в физиологической среде. При этом молекулярные механизмы биологической активности шунгитового наноглерода не охарактеризованы сколько-нибудь полно, особенно если иметь в виду данные последних лет о структурной организации нано- и субмикронных частиц шунгитового углерода и свойствах их водных нанодисперсий [Rozhkova et al., 2016]. В связи с этим важное значение имеет изучение закономерностей при взаимодействии природных шунгитовых углеродных наноструктур с биологическими системами на молекулярном уровне – уровне белковых молекул и клеточных мембран.

Ранее мы исследовали влияние наночастиц ШУ на эритроциты человека и ряда позвоночных *in vitro* различными методами. Было показано, что введение нанодисперсии ШУ в суспензию клеток в случае эритроцитов как человека, так и норки приводило к образованию агрегатов из дискоцитов [Горюнов и др., 2009; Rozhkov, Goryunov, 2013].

Целью настоящей работы было выявление *in vitro* тромбогенности углеродных наноструктур шунгита – т. е. их влияния на систему свертывания крови (по показателям времени рекальцификации плазмы) в сравнении с другими формами наноглерода (фуллеренами, нанодиамазами) человека и норки.

## Материалы и методы

Объектами исследования были: тромбоцитарная плазма крови человека и американской норки (*Mustela neovison*, ЗАО «Пряжинское», Карелия), приготовленная по стандартной методике; стабильные водные дисперсии наночастиц шунгитового углерода (ШУ), приготов-

Время рекальцификации плазмы крови в зависимости от концентрации наноуглерода, с

Time of blood plasma recalcification depending on nanocarbon concentration, s

Объект Object	Контроль Control	3 мкг/мл ШУ 3 µg/ml SC	6 мкг/мл ШУ 6 µg/ml SC	9 мкг/мл НА 9 µg/ml ND
плазма норки mink plasma	137,5 ± 76,7	132,5 ± 54,5	58,5 ± 2,2	не исследовали no research
плазма человека human plasma	107,5 ± 2,5	95,0 ± 5,0	92,5 ± 12,5	68 ± 8,5

ленные 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. ШУ предлагается рассматривать как представляющий собой 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 УНЧ [Rozhkova et al., 2016]. Дисперсия детонационных ультрадисперсных алмазов (наноалмазов (НА)) содержит гидратированные частицы размером 4–9 нм, которые также могут образовывать кластеры размером до 30 нм. Методом ДРС (динамического рассеяния света) с использованием анализатора Malvern Zetasizer измеряли дзета-потенциал нанодисперсий углерода. Он составил около –30 мВ для ШУ и –37 мВ для НА, что свидетельствует о коллоидной устойчивости изученных дисперсий.

Одним из интегральных методов исследования системы свертывания для оценки состояния тромбоцитарного и плазменного звена гемостаза является реакция рекальцификации, которая заключается в определении времени свертывания тромбоцитарной плазмы после добавления к ней раствора CaCl<sub>2</sub> оптимальной концентрации. В пробирку, установленную на водяной бане с температурой 37 °С, внесли 0,2 мл 0,277 % раствора CaCl<sub>2</sub> и 0,1 мл 0,85 % NaCl. Через 1 минуту добавляли 0,1 мл плазмы крови и определяли время образования сгустка [Лабораторные методы..., 1987]. В опытные образцы добавляли дисперсии ШУ (0,015 мл и 0,025 мл с исходной концентрацией 0,1 мг/мл) и немодифицированных НА (0,04 мл с исходной концентрацией 0,1 мг/мл).

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

## Результаты и обсуждение

В таблице представлены данные по времени рекальцификации плазмы, которое обратно пропорционально скорости образования сгустка из фибрина при добавлении в плазму крови Ca<sup>2+</sup>. Данный показатель отражает общую активность свертывающей системы и играет важную роль в поддержании нормального гомеостаза.

В присутствии 9 мкг/мл НА сгусток образовывался заметно быстрее, чем в контроле. Это согласуется с данными о том, что карбоксилированные наноалмазы в концентрации 1–5 мкг/мл вызывали активацию тромбоцитов крови, в которой были задействованы различные механизмы вплоть до изменения морфологии кровяных пластинок [Kumari et al., 2014].

Однозначного влияния наночастиц ШУ в концентрации 3 мкг/мл на активность свертывающей системы норки не выявлено (рис. 1, справа). Однако уже при концентрации 6 мкг/мл наблюдалось существенно более быстрое образование сгустка (рис. 1, посередине), который был гораздо плотнее и темнее, чем в контроле (рис. 1, слева).

В случае добавления углеродных наночастиц к плазме крови человека их влияние оказалось слабее – при обеих использованных концентрациях наблюдалось незначительное уменьшение времени рекальцификации, при этом форма сгустка оставалась такой же, как в контроле (рис. 2).

В свертывании крови участвуют тромбоциты и факторы свертывания крови, которые в норме находятся в неактивном состоянии. Для активации каскада процессов свертывания крови необходимы ионы кальция – добавление в образец крови с цитратной плазмой хлорида кальция CaCl<sub>2</sub> вызывает активацию внутренней системы свертывания с участием факторов XII, XI, IX и VIII, что активирует фактор X, а затем происходит превращение неактивного протромбина (белка плазмы крови) в фактор свертывания крови (активный тромбин), который, в свою очередь, вызывает превращение фибриногена в фибрин. Полимеризация фиб-



Рис. 1. Вид фибриновых сгустков из плазмы крови норки в эксперименте с дисперсией шунгитового углерода:

слева направо – контроль, 6 мкг/мл ШУ, 3 мкг/мл ШУ

Fig. 1. Fibrin clots of mink blood plasma in the experiment with shungite carbon dispersion:

from left to right – control, 6 µg/ml SC, 3 µg/ml SC

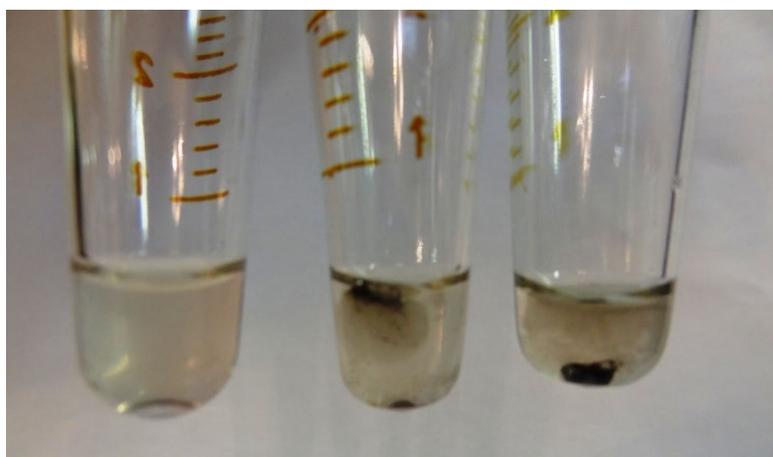


Рис. 2. Вид фибриновых сгустков из плазмы крови человека:

слева направо – контроль, 3 мкг/мл ШУ, 6 мкг/мл ШУ

Fig. 2. Fibrin clots of human blood plasma:

from left to right – control, 3 µg/ml SC, 6 µg/ml SC

рина завершает каскад реакций свертывания крови. Таким образом, скорость тромбообразования регулируется как реакциями, управляющими наработкой тромбина, так и реакциями, относящимися к непосредственной полимеризации фибрина. Поскольку время рекальцификации плазмы отражает как тромбоцитарное, так и плазменное звено гемостаза, его уменьшение может свидетельствовать об активации тромбоцитов наночастицами углерода. Нельзя исключать влияние наночастиц и на конечный этап свертывания крови – превращение фибриногена в фибрин.

Мы предполагаем, что гиперкоагуляция в присутствии шунгитового углерода может

быть связана с более быстрой полимеризацией фибрина, что является следствием его взаимодействия с углеродными наночастицами. Это взаимодействие явно прослеживается при более высокой концентрации ШУ (рис. 1, посередине), поскольку образовавшийся сгусток имеет черный цвет, в то время как при меньшей концентрации наночастиц сорбируется на поверхности фибринового сгустка (рис. 1, справа). Известно, что при внесении наночастиц в сыворотку крови *in vitro* фибриноген активно участвует в формировании белковой короны наночастиц. Так, показано, что для фибриногена при его взаимодействии с наночастицами  $\text{TiO}_2$  и  $\text{CeO}_2$  константа скорости свя-

звания была на два порядка больше, чем для сывороточного альбумина [Canoa et al., 2015], т. е. наночастицы в плазме крови связывались преимущественно с фибриногеном.

Можно предположить, что наночастицы шунгитового углерода способны индуцировать активацию тромбоцитов и/или их агрегацию так же, как это установлено для одностенных углеродных нанотрубок в концентрации 1–100 мкг/мл [Bihari et al., 2010]. Показано также, что оксид графена, имеющий отрицательно заряженную поверхность, активирует кровяные пластинки за счет переноса заряда на поверхность тромбоцита, вызывая изменения в мембранных белках, в то время как положительно заряженные частицы аминографена не проявляют тромботоксических свойств [Singh et al., 2012].

Таким образом, эксперименты показали, что даже при очень низких концентрациях углеродные наночастицы в среде активируют систему свертывания крови *in vitro*. Механизм действия включает активацию как начального, так и конечного пути свертывания крови. И наночастицы ШУ, и наноалмазы представляют собой кластеры наноглобул, т. е. форма и тех, и других НЧ – глобулярная, размер частиц также одного порядка – 30–100 нм. Отличия в величине эффекта, вероятно, обусловлены разницей исследованных нами наночастиц по величине поверхностного заряда, поскольку как наночастицы ШУ, так и наноалмазы в воде имеют отрицательно заряженную поверхность.

## Заключение

Несмотря на привлекательность наноматериалов для биомедицинских приложений, необходимо критически оценивать их возможную токсичность, в т. ч. и тромбогенность.

*Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221-2014-0039).*

## Литература

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.

## References

Goryunov A. S., Borisova A. G., Rozhkov S. P., Sukhanova G. A., Rozhkova N. N. Morfologiya i agre-

*Лабораторные методы исследования в клинике* / Под ред. В. В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987. 368 с.

Рожкова Н. Н. Наноглерод шунгитов. Петрозаводск: КарНЦ РАН, 2011. 100 с.

Шека Е. Ф., Рожкова Н. Н. Шунгит – природный источник наноразмерного восстановленного оксида графена // Труды КарНЦ РАН. 2016. № 2. С. 89–104. doi: 10.17076/geo264

Bihari P., Holzer M., Praetner M. et al. Single-walled carbon nanotubes activate platelets and accelerate thrombus formation in the microcirculation // *Toxicology*. 2010. Vol. 269, no. 2–3. P. 148–154. doi: 10.1016/j.tox.2009.08.011

Canoa P., Simon-Vazquez R., Popplewell J. et al. A quantitative binding study of fibrinogen and human serum albumin to metal oxide nanoparticles by surface plasmon resonance // *Biosens Bioelectron*. 2015. Vol. 74. P. 376–383. doi: 10.1007/s00204-016-1797-5

Geys J., Nemmar A., Verbeken E. et al. Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge // *Environ. Health Perspect*. 2008. Vol. 116, no. 12. P. 1607–1613. doi: 10.1289/ehp.11566

Koziara J. M., Oh J. J., Akers W. S. et al. Blood compatibility of cetyl alcohol/polysorbate-based nanoparticles // *Pharm. Res*. 2005. Vol. 22, no. 11. P. 1821–1828.

Kumari S., Singh M. K., Singh S. K. et al. Nanodiamonds activate blood platelets and induce thromboembolism // *Nanomedicine*. 2014. Vol. 9, no. 3. P. 427–440. doi: 10.2217/nmm.13.23

Mayer A., Vadon M., Rinner B. et al. The role of nanoparticle size in hemocompatibility // *Toxicology*. 2009. Vol. 258, no. 2–3. P. 139–147. doi: 10.1016/j.tox.2009.01.015

Miyamoto M., Sasakawa S., Ozawa T. et al. Mechanisms of blood coagulation induced by latex particles and the roles of blood cells // *Biomaterials*. 1990. Vol. 11, no. 6. P. 385–388.

Radomski A., Jurasz P., Alonso-Escolano D. et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis // *Br. J. Pharmacol*. 2005. Vol. 146, no. 6. P. 882–893.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Interaction of shungite carbon nanoparticles with blood protein and cell components // *Russian Journal of General Chemistry*. 2013. Vol. 83, no. 13. P. 2585–2595.

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Carbon nanomaterials sourcebook: graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamonds Roca Raton London New York, 2016. P. 151–174.

Singh S. K., Singh M. K., Kulkarni P. P. et al. Amine-modified graphene: thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for biomedical applications // *ACS Nano*. 2012. Vol. 6, no. 3. P. 2731–2740. doi: 10.1021/nl300172t

*Поступила в редакцию 02.11.2017*

gatsiya 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 research in clinic]. Moscow: Meditsina, 1987. 368 p.

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

Sheka E. F., Rozhkova N. N. Shungit – prirodnyi istochnik nanorazmernogo vosstanovlennogo oksida grafena [Shungite as a natural source of reduced nanosized graphene oxide]. *Trudy KarNTs RAN* [Trans. KarRC RAS]. 2016. No. 2. P. 89–104. doi: 10.17076/geo264

Bihari P., Holzer M., Praetner M. et al. Single-walled carbon nanotubes activate platelets and accelerate thrombus formation in the microcirculation. *Toxicology*. 2010. Vol. 269, no. 2–3. P. 148–154. doi: 10.1016/j.tox.2009.08.011

Canoa P., Simon-Vazquez R., Popplewell J. et al. A quantitative binding study of fibrinogen and human serum albumin to metal oxide nanoparticles by surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron*. 2015. Vol. 74. P. 376–83. doi: 10.1007/s00204-016-1797-5

Geys J., Nemmar A., Verbeken E. et al. Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge. *Environ. Health Perspect*. 2008. Vol. 116, no. 12. P. 1607–1613. doi: 10.1289/ehp.11566

Koziara J. M., Oh J. J., Akers W. S. et al. Blood compatibility of cetyl alcohol/polysorbate-based nanoparticles. *Pharm. Res*. 2005. Vol. 22, no. 11. P. 1821–1828.

Kumari S., Singh M. K., Singh S. K. et al. Nanodiamonds activate blood platelets and induce thromboembolism. *Nanomedicine*. 2014. Vol. 9, no. 3. P. 427–440. doi: 10.2217/nnm.13.23

Mayer A., Vadon M., Rinner B. et al. The role of nanoparticle size in hemocompatibility. *Toxicology*. 2009. Vol. 258, no. 2–3. P. 139–147. doi: 10.1016/j.tox.2009.01.015

Miyamoto M., Sasakawa S., Ozawa T. et al. Mechanisms of blood coagulation induced by latex particles and the roles of blood cells. *Biomaterials*. 1990. Vol. 11, no. 6. P. 385–388.

Radomski A., Jurasz P., Alonso-Escolano D. et al. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. *Br. J. Pharmacol*. 2005. Vol. 146, no. 6. P. 882–893.

Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Interaction of shungite carbon nanoparticles with blood protein and cell components. *Russian Journal of General Chemistry*. 2013. Vol. 83, no. 13. P. 2585–2595.

Rozhkova N. N., Rozhkov S. P., Goryunov A. S. Carbon nanomaterials sourcebook: graphene, fullerenes, nanotubes, and nanodiamonds Roca Raton London New York, 2016. P. 151–174.

Singh S. K., Singh M. K., Kulkarni P. P. et al. Amine-modified graphene: thrombo-protective safer alternative to graphene oxide for biomedical applications. *ACS Nano*. 2012. Vol. 6, no. 3. P. 2731–2740. doi: 10.1021/nn300172t

Received November 02, 2017

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРЕ:

**Борисова Александра Григорьевна**  
старший научный сотрудник, к. б. н.  
Институт биологии КарНЦ РАН,  
Федеральный исследовательский центр  
«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