

СИНТЕЗ НЕСЕЛЕКТИВНЫХ СОРБЕНТОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ УГЛЕРОДНЫМИ НАНОМАТЕРИАЛАМИ, И ИХ ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ

© 2022 г. А. П. Лыков^{1,2,*}, М. Опоку³, Л. Н. Рачковская¹, М. А. Суровцева¹, Н. А. Бондаренко¹, И. И. Ким¹, Э. Э. Рачковский¹, А. М. Володин⁴, О. В. Повещенко¹

¹Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза Минздрава России, Новосибирск, Россия

³Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

⁴Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, Новосибирск, Россия

*E-mail: aplykov2@mail.ru

Поступила в редакцию 13.05.2021 г.

После доработки 29.06.2021 г.

Принята к публикации 29.06.2021 г.

Актуальной задачей реаниматологии и токсикологии является поиск перспективных неселективных сорбентов на основе композитных материалов, в том числе с использованием углеродных наноматериалов. Проведены синтез и оценка биосовместимости сорбентов на основе γ -оксида алюминия и полидиметилсилоксана, модифицированных одностенными углеродными нанотрубками или углеродными нановолокнами. Выявлено, что синтезированные сорбенты сорбируют на своей поверхности низко- и средномолекулярные вещества, токсический эффект в отношении эритроцитов (гемолиз) наступает при длительной экспозиции (120 ч), краткосрочная (5 мин) экспозиция компонентов периферической крови человека с сорбентами приводит к потере количества тромбоцитов и лейкоцитов, в основном гранулоцитов, мононуклеаров периферической крови, а также краткосрочный и длительный контакт компонентов крови с образцами сорбентов способствует снижению метаболической активности клеток и активации продукции оксида азота. На основе полученных результатов можно предположить, что сорбент на основе γ -оксида алюминия и полидиметилсилоксана, модифицированный углеродными наноматериалами, является перспективным для разработки неселективных сорбентов.

DOI: 10.56304/S1992722322020133

ВВЕДЕНИЕ

Гемосорбция, метод экстракорпорального внепочечного очищения циркулирующей крови от токсических веществ на основе сорбции/адсорбции их на сорбентах, нашла свое применение для очистки крови у больных с хронической почечной и печеночной недостаточностью, при отравлениях лекарственными средствами, в лечении интоксикационного синдрома при сепсисе и пищевом отравлении [1–3]. Выделяют селективные (способны сорбировать определенные молекулы) и неселективные (способны сорбировать одновременно многие органические и неорганические соединения) сорбенты [4–6]. К недостаткам сорбентов на основе угля относится их “пыльность”, они могут приводить к накоплению обломков в тканях организма и инициировать воспаление. Во избежание нежелательного эффекта угольных сорбентов их модифицируют, например, термообработкой (спекание частиц угля в гранулы, пиролиз), покрытием их поверхности

органическими полимерными соединениями (инкапсулирование) [7]. На поверхности сорбентов при проведении гемосорбции сорбируются/адсорбируются не только биологически активные молекулы, но и адгезируют форменные элементы крови [8, 9]. Альтернативным источником создания неселективных сорбентов может выступать γ -оксид алюминия, являющийся ядром композиции, на поверхности которой формируется слой из углеродсодержащих соединений (лимонная кислота, сахароза, лактоза) [10, 11], или модификация поверхности γ -оксида алюминия полидиметилсилоксаном (ПДМС) [12]. Углеродные наноматериалы (углеродные нанотрубки (УНТ) и углеродные нановолокна (УНВ)) используются для создания композитных материалов. В [13] была разработана композиция на основе γ -оксида алюминия, ПДМС и одностенных углеродных нанотрубок (ОУНТ), обладающая высокой сорбционной активностью по отношению к метилновому голубому и витамину В₁₂. Одним из ос-

Таблица 1. Условия синтеза и характеристика углеродного нановолокна НП-44

Параметры	Образец НП-44
Катализатор	Ni–Cu/Al ₂ O ₃
Исходный материал	CH ₄
Масса образца, г	1.0
Масса УНВ, г	9.4
Выход УНВ, г	8.4
Плотность УНВ, г/см ³	0.08
Температура, °С	550
Время экспозиции, ч	4
Промывка в HCl	+
<i>S</i> , г/м ²	115
<i>V</i> , см ³ /г	0.45

Примечание. Al₂O₃ – оксид алюминия, CH₄ – метан, *S* – удельная поверхность, *V* – объем пор.

новых требований, предъявляемым к сорбентам, является биосовместимость, в том числе гемосовместимость.

Цель исследования – разработка и тестирование гемосовместимости неселективных сорбентов на основе γ-оксида алюминия, ПДМС и углеродных наноматериалов *in vitro*.

МЕТОДЫ

Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, от всех участников получено информированное согласие. Обогащенную тромбоцитами плазму получали из венозной крови доноров (*n* = 5) осаждением на центрифуге EBA200 (Hettich, Германия) при 3800 об./мин в течение 6 мин с использованием специализированных пробирок, содержащих гепарин натрия и тиксотропный гель (Плазмолифтинг, Россия). Далее полученную плазму с тромбоцитами переносили в стерильные центрифужные пробирки и повторно осаждали на центрифуге Biosan (Латвия) при 3500 об./мин в течение 15 мин. Обедненную тромбоцитами плазму переносили в стерильные центрифужные пробирки и использовали в качестве источника ростовых факторов. Осадок тромбоцитов дважды отмывали физиологическим раствором осаждением при 1500 об./мин в течение 5 мин. В камере Горяева подсчитывали количество тромбоцитов.

Обогащенную фракцию мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови человека (*n* = 5) получали на градиенте плотности фикокол/верографин (Панэко, Россия, ρ = 1.078 г/л) осаждением при 3000 об./мин на центрифуге Biosan в течение 20 мин с последующей отмывкой интерфазного кольца 5 мл забуференного физиологического

раствора (Биолот, Россия) при 1500 об./мин в течение 5 мин дважды. Подсчитывали количество выделенных МНК в камере Горяева.

Для создания композиций использовали γ-оксид алюминия (γ-Al₂O₃; ОАО Катализатор, Россия) с размером гранул от 0.2 до 0.8 мм. Полидиметилсилоксан (Пента, Россия) с молекулярной массой 18000–19000, диаметром частиц 60 мкм использован в виде водной эмульсии. Иммобилизацию ПДМС на поверхность гранул γ-Al₂O₃ (γ-Al₂O₃/ПДМС) проводили в водной фазе при комнатной температуре с последующим подсушиванием. ОУНТ получены от фирмы OCSiAl (Россия) в виде водной дисперсии Tuball Batt H₂O, содержащей 0.4 мас. % Tuball и 0.6 мас. % Наркобоксиметилцеллюлозы в качестве дисперсанта (Tuball-CMC) или Tuball Batt H₂O, содержащей 0.4 мас. % Tuball и 0.8 мас. % поливинилпирролидона (C₆H₉NO)_n молекулярной массой 12600 ± ± 2700 в качестве диспергента (Tuball-PVP). Согласно данным компании OCSiAl, приведенным в сертификате анализа, диаметр нанотрубок составляет 1.6 ± 0.4 нм, соотношение интенсивностей линий G/D в спектре комбинационного рассеяния света 532 нм составляет 80, удельная поверхность – 1120 м²/г, содержание примесей металла (Fe) – менее 0.6 мас. % сухого Tuball. Модификацию частиц γ-Al₂O₃/ПДМС проводили Tuball-CMC или Tuball-PVP путем физической адсорбции в водной фазе.

УНВ были синтезированы в Институте катализа (Новосибирск, Россия) на основе метана (CH₄) и катализатора Ni–Cu/Al₂O₃ (образец НП-44) с последующей отмывкой в соляной кислоте с целью удаления металлических частиц. Условия получения образца НП-44 приведены в табл. 1. Модификацию частиц γ-Al₂O₃/ПДМС образцом НП-44 проводили физической сорбцией в водной фазе.

Пористую структуру образцов исследовали методом низкотемпературной сорбции паров азота (77 К) на приборе DigiSorb-2600 (Micromeritics, США). Величину удельной поверхности, объем пор и размер пор рассчитывали исходя из экспериментальной изотермы сорбции азота. Адсорбционную активность образцов оценивали с использованием метиленового голубого (λ = 664 нм) и витамина B₁₂ (λ = 361 нм) на спектрофотометре (ApeIPD-303UV, Япония). В качестве контроля полученных композиций использовали γ-Al₂O₃/ПДМС и углеродминеральный сорбент СУМС-1, показавший эффективность в терапии острого гнойного парапроктита [14]. СУМС-1 получают при высокотемпературном пиролизе углеводородов при температуре 800°C на поверхности высокопрочного оксида алюминия с мезо-, макропористой структурой в кипящем слое с образо-

ванием на поверхности слоя пиролитического углерода до 10% [11]. Однако данная технология многостадийна, энергоемка, экологически небезопасна, что диктует необходимость разработки получения сорбентов менее затратным способом.

После краткосрочной экспозиции (5 мин, время, которое потребовалось для просачивания суспензии клеток через толщу сорбента) оценивали изменения в количестве тромбоцитов, лейкоцитов и популяции клеток белой крови в цельной периферической крови, а также количество обогащенной фракции тромбоцитов и МНК (95% лимфоцитов и 5% моноцитов) *in vitro*.

Для этого делали навески тестируемых сорбентов по 0.4 г и вносили в шприцы для инъекций на 2 см³, далее через слой образцов однократно пропускали 5×10^6 /мл тромбоцитов и 4×10^6 /мл МНК в 1 мл питательной среды, состоящей из культуральной среды Дюльбеко (модифицированная среда Игла, ДМЕМ; Биолот, Россия) с добавлением 10% аутологичной плазмы, 2 мМ L-глутамина (Merck, США) и 50 мкг/мл гентамицина сульфата (Дальхимфарм, Россия), и по 1 мл гепаринизированной цельной периферической крови, разведенной питательной средой (1:1). На выходе из суспензии клеток забирали необходимый объем суспензии обогащенной фракции тромбоцитов, МНК, цельной крови для подсчета количества клеток. Кроме этого, цельную кровь, пропущенную через сорбенты, забирали на исследование популяций лейкоцитов (мазок на стекле) и для оценки гемолиза. Объем остатка суспензии тромбоцитов, МНК и цельной крови после пропускания через слой сорбентов доводили до 1 мл питательной средой. Далее клетки переносили в 24-луночные планшеты (TPP, Швейцария) и культивировали в течение 120 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% воздуха в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония).

После длительной экспозиции (120 ч) суспензии клеток (обогащенная фракция тромбоцитов, МНК) исследовали изменения только функционального статуса клеток (МТТ-тест (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид), продукция оксида азота, гемолиз).

Для этого обогащенную фракцию тромбоцитов (5×10^6 /мл), МНК (4×10^6 /мл) вносили в лунки 24-луночного планшета с питательной средой, состоящей из культуральной среды ДМЕМ с добавлением 10% аутологичной плазмы, 2 мМ L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина сульфата, добавляли по 1 мг тестируемых образцов. Далее смесь клеток и сорбентов инкубировали в течение 120 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% воздуха в CO₂-инкубаторе. Далее за 4 ч до окончания инкубационного срока удаляли надосадочную жидкость (часть надосадочной жидкости использовали для оценки уровней продукции оксида азота),

вносили 1 мл ДМЕМ и 10 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (МТТ, Merck, США). Через 4 ч инкубации клеток с МТТ удаляли надосадочную жидкость и вносили по 300 мкл диметилсульфоксида (Merck, США) в лунки для разрушения клеточной мембраны в течение 10 мин при комнатной температуре, переносили по 100 мкл в 96-луночный плоскодонный планшет (TPP, Швейцария) триплетами, оптическую плотность продукта реакции в лунке оценивали спектрофотометрически при длине волны 492 нм (StatFax 2100, США), выражали в условных единицах оптической плотности (ед. опт. плот.).

Влияние образцов на секреторный потенциал тромбоцитов и МНК оценивали по уровню продукции стойких метаболитов оксида азота (NO)—нитритов (NO₂) с использованием реактива Грисса спектрофотометрически при длине волны 570 нм. Калибровочную кривую строили с использованием 1 мМ раствора нитрита натрия, выражали в мкМ/мл.

Токсическое действие сорбентов в отношении эритроцитов оценивали по уровню гемолиза *in vitro*. Уровни гемолиза при краткосрочной экспозиции цельной крови доноров с образцами сорбентов проводили сразу после пропускания крови через столбец сорбентов. Для оценки гемолиза при длительной экспозиции цельной крови с образцами сорбентов к 1 мл смеси цельной крови с питательной средой (1:1) вносили по 1 мг образцов сорбентов. Далее инкубировали в течение 120 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂/95% воздуха в CO₂-инкубаторе. Интенсивность гемолиза при краткосрочной и длительной экспозиции определяли на спектрофотометре при длине волны 492 нм. Для этого после осаждения планшетов в центрифуге при 3000 об./мин в течение 5 мин забирали надосадочную жидкость по 100 мкл (триплетами) и переносили в 96-луночные плоскодонные планшеты. Интенсивность гемолиза выражали в ед. опт. плот.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Statistica 10.0 for Windows. Распределение Гаусса для полученных данных оценивали с использованием w-критерия Шапиро—Уилкса, в таблицах данные представлены в виде средней величины и стандартного отклонения ($M \pm SD$), статистическую значимость различий между образцами оценивали однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) с поправкой по Бонферрони (Bonferroni post hoc test) и принимали при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Условия синтеза и физико-химическая характеристика образцов сорбентов на основе γ -оксида

Таблица 2. Физико-химические свойства образцов на основе γ -оксида алюминия, ПДМС и углеродных наноматериалов

Параметры	γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС	γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/НП-44	γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-PVP	γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-СМС
Размер частиц, мм	0.2–0.8			
ОУНТ (Tuball), С, %			0.04	0.04
PVP, С, %			0.08	
СМС, С, %				0.06
НП-44, С, %		0.04		
Термообработка, °С	150.0			
S, г/м ²	193.5		1192.9	180.0
V, г/см ³	0.32		0.32	0.4
МС, мг/г	10.4	8.8*	7.1*	6.8*
V ₁₂ , мг/г	0.6		1.0*	7.8*

Примечание. С, % – концентрация вещества, PVP – поливинилпирролидон, СМС – карбоксиметилцеллюлоза натриевая соль, НП-44 – образец углеродного нановолокна на основе метана, S – удельная поверхность, V – объем пор, МС – сорбция метиленового синего, V₁₂ – сорбция витамина В₁₂.

* С образцом γ -Al₂O₃/ПДМС $p < 0.05$.

Таблица 3. Влияние длительности экспозиции цельной периферической крови человека с сорбентами на интенсивность гемолиза

Параметры	Экспозиция	
	краткосрочная	длительная
Уровни гемолиза, ед. опт. плот.		
Контроль	0.44 ± 0.01	
СУМС-1	0.42 ± 0.01	0.77 ± 0.01 ^{1, 2}
γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС	0.44 ± 0.02	0.95 ± 0.01 ^{1, 2}
γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/НП-44	0.45 ± 0.01 ³	0.86 ± 0.01 ¹⁻⁴
γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-PVP	0.44 ± 0.01	0.85 ± 0.01 ²⁻⁴
γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-СМС	0.45 ± 0.01	2.39 ± 0.12 ¹⁻⁶

Примечание. $p < 0.05$: 1 – с аналогичным параметром при кратковременной экспозиции, 2 – с базальным уровнем, 3 – с СУМС-1, 4 – с γ -Al₂O₃/ПДМС, 5 – с γ -Al₂O₃/ПДМС/НП-44, 6 – с γ -Al₂O₃/ПДМС/Tuball-PVP.

алюминия, ПДМС и углеродных наноматериалов приведены в табл. 2. Образцы различались по удельной поверхности, объему пор и сорбционной активности по отношению к красителю метиленовому синему и витамину В₁₂. Объем пор в исследованных сорбентах задается в основном матрицей – оксидом алюминия, а химическая природа поверхности сорбентов – “сеткой” гидрофильных центров за счет матрицы и гидрофобных центров за счет углеродной компоненты. Сорбаты (сорбируемые молекулы) в своем составе также содержат участки гидрофильно-гидрофобной природы, обладающие сродством с химической природой поверхности пористого сорбента.

О гемосовместимости сорбентов можно судить по уровню гемолиза. Установлено, что при краткосрочном контакте цельной крови с поверхностью сорбентов существенного прироста разрушения эритроцитов по сравнению с контролем не выявлено. В то же время показан значимый прирост интенсивности гемолиза при контакте с сорбентом, особенно с γ -Al₂O₃/ПДМС/Tuball-СМС, по сравнению с контролем и уровнями гемолиза при краткосрочной экспозиции (табл. 3, $p < 0.05$).

Следующим этапом оценки биосовместимости сорбентов стало изучение влияния различных сроков контакта компонентов периферической

Таблица 4. Влияние краткосрочной экспозиции сорбентов на количество тромбоцитов, лейкоцитов и популяцию лейкоцитов в цельной крови

Параметры	Контроль	СУМС-1	γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС	γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/НП-44	γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-PVP	γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-СМС
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	1.88 ± 0.16	0.63 ± 0.05 ¹	0.31 ± 0.03 ^{1, 2}	0.63 ± 0.05 ^{1,3}	1.25 ± 0.1 ¹⁻⁴	0.63 ± 0.05 ^{1, 3, 5}
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8.5 ± 0.41	6.79 ± 0.13 ¹	3.88 ± 0.13 ^{1, 2}	3.2 ± 0.14 ¹⁻³	5.73 ± 0.22 ¹⁻⁴	5.58 ± 0.29 ¹⁻⁴
Нейтрофилы, %	53.33 ± 0.94	43.33 ± 0.94 ¹	25.0 ± 0.82 ^{1, 2}	20.67 ± 0.94 ¹⁻³	36.67 ± 1.25 ¹⁻⁴	36.0 ± 1.63 ¹⁻⁴
Эозинофилы, %	3.67 ± 0.47	3.67 ± 0.47	1.67 ± 0.47 ^{1,2}	1.67 ± 0.47 ^{1,2}	1.67 ± 0.47 ^{1,2}	1.67 ± 0.47 ^{1,2}
Моноциты, %	1.67 ± 0.47	9.33 ± 0.94 ¹	7.0 ± 0.82 ^{1,2}	4.33 ± 0.47 ¹⁻³	9.33 ± 0.94 ^{1, 3, 4}	5.0 ± 0.82 ^{1-3, 5}
Лимфоциты, %	37.33 ± 1.89	45.0 ± 2.16 ¹	66.33 ± 2.05 ^{1, 2}	74.0 ± 1.63 ¹⁻³	52.33 ± 2.62 ^{1, 2, 4}	58.0 ± 2.45 ^{1, 2, 4}

Примечание. $p < 0.05$: 1 – с аналогичным параметром при кратковременной экспозиции, 2 – с СУМС-1, 3 – с γ -Al₂O₃/ПДМС, 4 – с γ -Al₂O₃/ПДМС/НП-44, 5 – с γ -Al₂O₃/ПДМС/Tuball-PVP.

Таблица 5. Влияние краткосрочной экспозиции с сорбентами обогащенной фракции тромбоцитов и МНК периферической крови доноров на их количество

Параметры	Тип клеток	
	тромбоциты	МНК
Контроль	4.58 ± 0.51	5.25 ± 2.41
СУМС-1	1.53 ± 0.24*	1.61 ± 0.63*
γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС	2.47 ± 0.86*	0.83 ± 0.24*
γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/НП-44	2.13 ± 0.62*	1.57 ± 0.61*
γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-PVP	1.52 ± 0.57*	1.97 ± 0.83*,**
γ -Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-СМС	1.73 ± 0.52*	1.23 ± 0.56*

Примечание. $p < 0.05$: *с контролем; ** с γ -Al₂O₃/ПДМС.

крови на количественные и функциональные параметры.

Как видно из табл. 4, краткосрочная экспозиция цельной крови с сорбентами способствовала значимому снижению количества тромбоцитов и лейкоцитов по сравнению с исходным уровнем ($p < 0.05$). Более того, не модифицированный ОУНТ или УНВ комплекс γ -оксида алюминия с ПДМС проявлял большую сорбционную активность по отношению к тромбоцитам. Популяционный состав лейкоцитов показал, что к поверхности сорбентов в большей степени адгезируют нейтрофилы, что привело к увеличению относи-

тельного количества лимфоцитов и моноцитов по сравнению с исходными показателями.

Установлено, что краткосрочная экспозиция обогащенной фракции тромбоцитов и МНК с сорбентами существенно активировала прилипание клеток к поверхности сорбентов, что приводило к уменьшению количества клеток в 2 раза по сравнению с исходным уровнем (табл. 5, $p < 0.05$).

Следующим этапом оценки биосовместимости сорбентов с компонентами периферической крови человека стала оценка функциональных свойств обогащенной фракции тромбоцитов и МНК. В МТТ-тесте, отражающем метаболическую активность **НАДФ-Н**-зави-

Таблица 6. Влияние экспозиции сорбентов на функциональный потенциал обогащенной фракции тромбоцитов человека

Параметры	Длительность экспозиции	
	краткосрочная	длительная
Активность НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз, ед. опт. плот.		
Контроль	0.39 ± 0.02	0.42 ± 0.03
СУМС-1	0.32 ± 0.04 ²	0.35 ± 0.04
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС	0.3 ± 0.12	0.34 ± 0.01 ²
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/НП-44	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.03 ²
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-PVP	0.32 ± 0.01 ^{2,5}	0.33 ± 0.05 ²
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-СМС	0.34 ± 0.02 ^{2,5,6}	0.37 ± 0.03
Уровни секреции стойких метаболитов NO–NO ₂ , мкМ/мл		
Контроль	29.72 ± 6.82	72.0 ± 0.54 ¹
СУМС-1	54.52 ± 14.37 ²	21.07 ± 1.88 ^{1,2}
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС	62.09 ± 1.28 ²	353.64 ± 7.92 ^{1,2,3}
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/НП-44	268.62 ± 2.74 ^{2–4}	379.61 ± 4.31 ^{1–4}
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-PVP	138.53 ± 4.19 ^{2–5}	242.65 ± 9.18 ^{1,3,4,5}
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-СМС	75.91 ± 7.72 ^{2–5}	441.22 ± 62.71 ^{1,2,3,6}

Примечание. *p* < 0.05: 1 – с аналогичным параметром при кратковременной экспозиции, 2 – с базальным уровнем, 3 – с СУМС-1, 4 – с γ-Al₂O₃/ПДМС, 5 – с γ-Al₂O₃/ПДМС/НП-44, 6 – с γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-PVP.

симых оксидоредуктаз (никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидаза), краткосрочная экспозиция обогащенной фракции тромбоцитов с СУМС-1, γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-PVP, γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-СМС способствовала снижению метаболической активности тромбоцитов по сравнению с контролем. С другой стороны, показано, что контакт тромбоцитов с поверхностью сорбентов увеличивал уровни продукции стойких метаболитов оксида азота по сравнению с контролем, особенно при контакте с сорбентами γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-PVP и γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-PVP (табл. 6, *p* < 0.05).

В отношении МНК установлено, что краткосрочная экспозиция клеток с сорбентами γ-Al₂O₃/ПДМС, γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-PVP и γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-СМС значительно подавляет метаболическую активность клеток по сравнению с контролем (табл. 7, *p* < 0.05). Также показано увеличение уровней оксида азота в кондиционной среде МНК после контакта с сорбентами, за исключением сорбента СУМС-1, по сравнению с контролем (*p* < 0.05).

Что касается эффекта длительной экспозиции сорбентов с обогащенной фракцией тромбоцитов и МНК, то установлено, что сорбенты, за исключением СУМС-1 и γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-СМС, подавляют метаболическую активность тромбоцитов по сравнению с контролем и увеличивают уровни продукции оксида азота тромбоцитов

(табл. 6, *p* < 0.05). Длительный контакт МНК с сорбентами значимо снижал метаболический потенциал клеток и увеличивал уровни оксида азота в кондиционной среде МНК по сравнению с контролем (табл. 7, *p* < 0.05).

Существенных различий по влиянию сорбентов на метаболическую активность обогащенной фракции тромбоцитов с учетом длительности экспозиции их с сорбентами (*p* > 0.05) не выявлено. В то же время увеличение сроков экспозиции тромбоцитов с сорбентами, за исключением СУМС-1, способствовало приросту уровней оксида азота в кондиционной среде тромбоцитов (*p* < 0.05). Также нет существенных различий по влиянию сроков экспозиции МНК с сорбентами на их метаболическую активность, но увеличение сроков контакта МНК с сорбентами увеличивает уровни оксида азота в кондиционной среде (*p* < 0.05).

Корреляционный анализ выявил высокую и обратную зависимость активности между НАДФ-Н-зависимыми оксидоредуктазами тромбоцитов при кратковременной экспозиции с γ-Al₂O₃/ПДМС и уровнями продукции оксида азота в ответ на кратковременную экспозицию с сорбентами, модифицированными ОУНТ (*r* = –0.87, *p* = 0.024 и *r* = –0.94, *p* = 0.005 соответственно для γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-СМС и γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-PVP). Между активностью НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз тромбоцитов при длительной экспозиции с γ-Al₂O₃/ПДМС и уровня-

Таблица 7. Влияние длительности экспозиции сорбентов на функциональный потенциал МНК периферической крови человека

Параметры	Длительность экспозиции	
	краткосрочная	длительная
Активность НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз, ед. опт. плот.		
Контроль	0.53 ± 0.03	0.56 ± 0.03
СУМС-1	0.39 ± 0.12 ²	0.47 ± 0.03 ²
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС	0.37 ± 0.08 ²	0.42 ± 0.03 ²
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/НП-44	0.42 ± 0.14	0.48 ± 0.05 ²
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-PVP	0.42 ± 0.05 ²	0.38 ± 0.07 ^{2,4}
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-СМС	0.46 ± 0.02 ^{2,4}	0.46 ± 0.02 ^{2,4,6}
Уровни секреции стойких метаболитов NO–NO ₂ , мкМ/мл		
Контроль	20.4 ± 1.19	28.78 ± 5.4 ¹
СУМС-1	7.59 ± 2.45 ¹	39.92 ± 3.16 ^{1,2}
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС	57.2 ± 4.0 ^{2,3}	204.33 ± 13.09 ^{1–3}
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/НП-44	235.88 ± 9.26 ^{2–4}	327.47 ± 20.39 ^{1,2,4}
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-PVP	494.98 ± 4.73 ^{2,4,5}	532.67 ± 10.72 ^{1–5}
γ-Al ₂ O ₃ /ПДМС/Tuball-СМС	123.82 ± 4.09 ^{2–6}	353.73 ± 45.38 ^{1–6}

Примечание $p < 0.05$: 1 – с аналогичным параметром при кратковременной экспозиции, 2 – с базальным уровнем, 3 – с СУМС-1, 4 – с γ-Al₂O₃/ПДМС, 5 – с γ-Al₂O₃/ПДМС/НП-44, 6 – с γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-PVP.

ми продукции оксида азота при экспозиции с γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-СМС имеется прямая и сильная взаимосвязь ($r = 0.89$, $p = 0.019$), а активность НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз тромбоцитов при длительной экспозиции с γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-PV находилась в обратной и сильной взаимосвязи со спонтанным уровнем продукции оксида азота в ответ на экспозицию с γ-Al₂O₃/ПДМС ($r = -0.89$, $p = 0.019$).

Установлена прямая и сильная взаимосвязь активности НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз МНК в ответ на краткосрочную экспозицию с γ-Al₂O₃/ПДМС с уровнями продукции оксида азота при краткосрочной экспозиции с сорбентом, модифицированным УНВ ($r = 0.81$, $p = 0.049$). Активность НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз в ответ на длительную экспозицию МНК с γ-Al₂O₃/ПДМС находилась в прямой и сильной сопряженности с уровнями продукции оксида азота в ответ на экспозицию с сорбентами, модифицированными ОУНТ или УНВ ($r = 0.81$, $p = 0.049$ и $r = 0.93$, $p = 0.008$ соответственно для γ-Al₂O₃/ПДМС/НП-44 и γ-Al₂O₃/ПДМС/Tuball-PV).

ОБСУЖДЕНИЕ

Гемосорбция – способ экстракорпоральной очистки крови от токсинов, основанный на использовании сорбентов, активно или пассивно

связывающих токсические компоненты из крови при ее прохождении через емкости, содержащие сорбенты. В качестве сорбентов используют активированный уголь, ионообменные смолы, биоспецифические сорбенты. Сорбенты на основе волокон древесного угля характеризуются высокой площадью поверхности до 1200 м²/г, эффективно связывают бромталеин и инулин, что соответствует средним и высокомолекулярным массам веществ, не вызывают значимых изменений в периферической крови *in vivo*, а *in vitro* отмечено снижение адгезии лейкоцитов и тромбоцитов [15]. Сорбенты (углеродный перфузионный аппарат и смоляной перфузионный аппарат) показали свою эффективность у больных с печеночной недостаточностью [16].

Для придания сорбентам новых физико-химических свойств с целью повышения сорбционного потенциала их поверхность модифицируют различными химическими реагентами. Так, для модифицирования сорбентов на основе углеродных материалов используют аминокaproновую кислоту, флуорин, поливинилпирролидон, битублин, аргинин [17]. Отмечена эффективность антипротеазного сорбента Увосорб у больных с сепсисом, что связано с уменьшением количества циркулирующих провоспалительных цитокинов и увеличением количества противовоспалительных цитокинов [18]. Сравнительный анализ эффективности гемоперфузий при эксперименталь-

ном перитоните с использованием сорбентов СКН-1, КАУ, АУ-Л выявил наличие побочных эффектов в отношении низкой сорбции сахара крови или токсинов [19]. Сорбент на основе полидопамина, декорированного упорядоченным мезопористым углеродом, обладающий высокой удельной поверхностью и сродством к гидрофобным анализам, эффективно связывает билирубин [20]. *In vitro*-контакт эритроцитов с композиционным сорбентом на основе полидопамина и мезопростоуго углерода не вызывал адгезию и гемолиз [20].

Особый интерес вызывают сорбенты на основе оксида алюминия с дополнительной модификацией его поверхности органическими соединениями, образующими прочные комплексы с ионами Al^{3+} . Показано, что модификация сорбента на основе $\gamma-Al_2O_3$ тайроном (динатриевая соль 4,5-дигидрокси-*m*-бензолдисульфоновой кислоты) способствовала сорбции меди(II) на поверхности сорбента по типу комплексобразования с тайроном [21]. В проводимом исследовании получены неселективные сорбенты на основе $\gamma-Al_2O_3$ с иммобилизованным на его поверхности ПДМС с последующей модификацией их поверхности ОУНТ или УНВ. Образцы композитных сорбентов и контроля (не модифицированные ОУНТ или УНВ частицы $\gamma-Al_2O_3$ /ПДМС и сорбент на основе углерода – СУМС-1) были протестированы на биосовместимость с форменными элементами периферической крови человека (цельная кровь, обогащенная фракция тромбоцитов и обогащенная фракция МНК крови). Выбор объекта исследования гемосовместимости полученных образцов с тромбоцитами обусловлен тем, что данные клетки периферической крови играют важную роль в обеспечении первичного гемостаза [22]. Показано, что после прохождения периферической крови через сорбент происходит активация клеточных элементов крови. Так, кратковременный контакт (5 мин) периферической крови *in vitro* с поверхностью сорбента СКТ-6А-ВЧ (угольный поливалентный, деминерализованный и дополнительно очищенный сорбент) при малообъемной гемоперфузии способствовал снижению количества лейкоцитов и тромбоцитов как следствие адгезии нейтрофилов и тромбоцитов к поверхности сорбента и увеличению относительного количества МНК в популяционном составе лейкоцитов за счет прилипания полиморфноядерных популяций лейкоцитов, а также снижению миграционной активности лейкоцитов [23]. Более того, увеличение сроков контактирования клеток цельной крови с сорбентом СКТ-6А-ВЧ (120 мин) значимо уменьшает количество лейкоцитов и тромбоцитов в 2 раза. Кроме этого, под влиянием взаимодействия нейтрофилов с гранулами сорбента активируются НАДФ-

оксидаза и миелопероксидаза, что способствует увеличению уровня продукции активных форм кислорода. Контакт клеток крови с сорбентом способствовал увеличению уровня стойких метаболитов оксида азота в сыворотке крови доноров.

Показано, что длительный контакт обогащенной фракции тромбоцитов и МНК с сорбентами на основе частиц $\gamma-Al_2O_3$ /ПДМС и модификаторов существенно подавлял активность НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз в тромбоцитах, но при этом способствовал секреции оксида азота. Выявленные изменения метаболической активности тромбоцитов и МНК в доступной литературе не исследовались, что затрудняет их сопоставление с данными других исследователей. Показано, что контакт цельной периферической крови с мембраной из нанопористого алюминия с размером пор в 20 и 200 нм, по данным сканирующей электронной микроскопии, способствует задержке тромбоцитов в порах размером 200 нм и практически их отсутствию на мембранах из нанопористого алюминия с размером пор 20 нм [24]. *In vitro*-контакт (от 30 до 300 мин) элементов цельной крови человека с сорбентом на основе древесного угля способствует уменьшению количества тромбоцитов и лейкоцитов [15].

Отметим, что при длительном культивировании тромбоцитов *in vitro* с сорбентами определенная часть клеток могла сорбироваться на поверхности частиц образцов, что могло способствовать гибели части клеток, а также при взаимодействии поверхностных молекул тромбоцитов с сорбентами запускать механизмы их активации на более ранних сроках экспозиции и, как следствие, истощения их к концу срока эксперимента. Известно, что гемосорбенты должны обладать совместимостью с компонентами крови, в том числе с эритроцитами. В проведенном исследовании показано, что только при длительной экспозиции цельной крови с композитными сорбентами, также как и с контрольными компонентами, выявляется гемолиз эритроцитов, особенно при наличии в составе ОУНТ диспергента Na-карбоксиметилцеллюлозы. Полученные данные о гемолизе эритроцитов не противоречат данным [25], указывающим на уменьшение количества эритроцитов при использовании углеродных сорбентов.

Показано, что при 10-кратном пропускании 50 мл периферической крови больных с пузырчаткой и дисковидной красной волчанкой через активированный древесный угольный сорбент СКН отмечено увеличение способности мононуклеаров периферической крови отвечать на миогенные стимулы (конканавалин А и фитогемагглютинин) продукцией IL-1, -2, восстановлением активности естественных киллерных клеток и антителозависимой цитотоксичности [26].

В доступной литературе не нашлось данных по влиянию угольных сорбентов на субпопуляционный состав МНК. Выявленное существенное уменьшение количества МНК после краткосрочного контакта с сорбентами может быть следствием адгезии МНК на поверхности сорбентов и уменьшения их на выходе.

Сопоставляя эффекты сорбентов на форменные элементы крови и их функциональный потенциал, отметим, что контрольный сорбент СУМС-1 менее выражено вызывает гемолиз, адгезию лейкоцитов, в том числе полиморфноядерных лейкоцитов, на своей поверхности, а также в меньшей степени влияет на метаболическую активность и уровни продукции стойких метаболитов оксида азота МНК по сравнению с сорбентами, модифицированными ОУНТ или УНВ. Это может быть следствием того, что наноматериалы обладают токсичностью по отношению к различным типам клеток человека и животных [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом пассивной сорбции при комнатной температуре синтезированы неселективные алюмокремниевые сорбенты, модифицированные углеродными наноматериалами, проявляющие способность сорбировать на своей поверхности молекулы с различной молекулярной массой (метиленовый синий, витамин В₁₂).

Эксперименты *in vitro* показали, что интенсивность гемолиза эритроцитов возрастает с увеличением сроков экспозиции цельной крови человека с сорбентами, краткосрочная экспозиция цельной крови человека способствует уменьшению количества тромбоцитов и лейкоцитов в основном за счет гранулоцитов. Краткосрочная и длительная экспозиции обогащенной фракции тромбоцитов и МНК периферической крови человека вызывают снижение метаболической активности клеток, но активируют уровни синтеза стойких метаболитов оксида азота. Следовательно, сорбент на основе γ -оксида алюминия и ПДМС, модифицированный углеродными наноматериалами, является перспективным для разработки неселективных сорбентов, в том числе гемосорбентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимова Н.Ю., Киселевский М.В., Громова Е.Г. и др. // Медицинский алфавит. Неотложная медицина. 2011. Т. 4. № 18. С. 29.
2. Кутепов Д.Е. // Казанский медицинский журнал. 2014. Т. 95. № 1. С. 75.
3. Синило С.Б. Методы детоксикации в хирургии: учеб.-метод. пособие. Минск: БГМУ, 2008. 30 с.
4. Морозов А.С., Бессонов И.В., Нуждина А.В. и др. // Общая реаниматология. 2016. Т. 12. № 6. С. 82.
5. Кирковский В.В., Колесникова И.Г., Лобачева Г.А. и др. // Журн. им. Н.В. Склифосовского. Неотложная медицинская помощь. 2016. № 2. С. 16.
6. Попов В.Л., Собко И.В., Самодумова И.М. // Клиническая хирургия. 1997. № 7–8. С. 87.
7. Петросян Э.А., Оноприев В.И., Лайпанов Х.И.-Х.М. и др. // Кубанский научный медицинский вестник. 2006. № 3–4. С. 87.
8. Буркова Н.В., Кузнецов С.И., Тюкавин А.И. // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии постдипломного образования. 2011. Т. 3. № 4. С. 24.
9. Якубовская Р.И., Иванова Л.М., Немцова Е.Р. и др. // Анестезиол. реаниматол. 1993. № 3. С. 55.
10. Рачковская Л.Н., Коненков В.И., Пармон В.Н. и др. Способ получения углеродминерального сорбента. Пат. 2529535 (Россия). 2014.
11. Рачковская Л.Н. Способ получения углеродминерального сорбента СУМС-1. Пат. 2143946 (Россия). 2000.
12. Рачковская Л.Н., Бородин Ю.И., Асташова Т.А. и др. Пористый сорбент на основе оксида алюминия. Пат. 2126293 (Россия). 1999.
13. Рачковская Л.Н., Лыков А.П., Повещенко О.В. и др. Углеродминеральный пористый сорбент на основе оксида алюминия, полидиметилсилоксана и одностенных углеродных нанотрубок. Пат. 2727378 (Россия). 2020.
14. Семченко Д.Ю., Полуэктов Л.В., Степанов С.С. и др. // Хирургия. 2002. № 12. С. 38.
15. Gundermann K.J., Uhlhaas S., Grün U. et al. // Artif. Organs. 1983. V. 7. № 2. P. 186. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.1983.tb04185.x>
16. Yan G.S., Li L.L., Jiang S.L. et al. // Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi. 2019. V. 27. № 1. P. 51. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2019.01.011>
17. Пьянова Л.Г., Лихолобов В.А., Седанова А.В. и др. // Russian J. General Chem. 2020. V. 90. № 3. P. 550. <https://doi.org/10.1134/S1070363220030305>
18. Якубцевич Р.Е., Спас В.В., Шпель И.А. и др. // Анестезиол. реаниматол. 2008. № 6. С. 55.
19. Касымов А.Х., Гутникова А.Р., Исмаилова М.Г. и др. // Клиническая хирургия. 2001. № 1. С. 43.
20. Huang S., Zheng J., Zhang Y. et al. // J. Mater. Chem. B. 2020. V. 8. № 2. P. 290. <https://doi.org/10.1039/c9tb02147g>
21. Тихомирова Т.И., Кубышев С.С., Иванов А.В. и др. // Журн. физ. химии. 2009. Т. 83. № 7. С. 1360.
22. Марковчин А.А. // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 6. С. 1437.
23. Буркова Н.В., Кузнецов С.И., Тюкавин А.И. // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования. 2011. Т. 3. № 4. С. 24.
24. Ferraz N., Hong J., Karlsson Ott M. // J. Biomater. Appl. 2010. V. 24. № 8. P. 675. <https://doi.org/10.1177/0885328209338639>
25. Иванова Н.С., Пак Т.С. // Символ науки. 2016. № 4. С. 100.
26. Grando S.A., Glukhenkyt G.N., Drannik N. et al. // Immunology. 1989. V. 66. P. 138.
27. Митрофанова И.В., Мильто И.В., Суходоло И.В. и др. // Бюл. сиб. мед. 2014. Т. 13. № 1. С. 135.