

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

Специальность: 010701.65 – «Физика»

«Медицинская физика»

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

(Дипломная работа)

**Исследование клеток тимоцитов под действием лекарственного
препарата димефосфона методами сканирующей зондовой микроскопии**

Работа завершена:

" ___ " _____ 2015г. _____ (Р.М.Зарипова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.ф.-м.н, доцент

" ___ " _____ 2015 г. _____ (О.А. Коновалова)

Заведующий кафедрой медицинской физики:

д.х.н., профессор

" ___ " _____ 2015 г. _____ (А.В. Аганов)

Казань – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Современные методы в микроскопии.....	6
1.1.1 СЗМ эксперименты на клеточных структурах.....	9
1.2 Атомно-силовая микроскопия.....	11
1.2.1 Контактная атомно-силовая микроскопия.....	11
1.2.2 Полуконтактная атомно-силовая микроскопия.....	12
1.2.3 Метод рассогласования.....	15
1.2.4 Метод фазового контраста.....	16
1.3 Фосфорорганическое соединение: Димефосфон.....	18
1.4 Клетки тимуса: тимоциты.....	20
2 ЭКСПЕРИМЕНТ.....	23
2.1 Материалы и методы.....	23
2.2 Обсуждение результатов.....	27
2.2.1 Влияние 7% и 15% ДМФ на клетки тимоциты.....	27
2.2.2 Влияние 0,1% и 0,2% ДМФ на клетки тимоциты.....	38
2.2.3 Супрамолекулярная структура ДМФ на наноразмерных поверхностях слюды и пирографита при разной концентрации ДМФ (0,1%, 0,2%, 7% и 15%).....	50
Общие результаты и выводы.....	57
Список литературы.....	59
Приложение.....	67

ВВЕДЕНИЕ

Морфология клеточной мембраны является важным параметром, характеризующая состояние жизнеспособности клетки при различных внешних воздействиях [1-4]. Ей отводится ключевая роль в процессе функционирования отдельных клеточных органелл и клетки в целом [5]. Дезорганизация мембраны вследствие внешнего воздействия может приводить к нарушению внутриклеточных процессов синтеза макромолекул, нарушению созревания клеток и выходу в кровь неполноценных клеток, неспособных выполнять свои функции.

Изучение морфологии клеток традиционно ведется посредством различных микроскопических методов [1-3, 6-9]. Так использование оптической микроскопии позволяет исследовать клетки, находящиеся в прижизненном состоянии, а в сочетании с флуоресцентными методами окраски оценивать их физиологическое состояние [10, 11]. Ограничение, в данном случае, связано с невозможностью фиксировать тонкие морфологические изменения клеток, не говоря уже о поверхности мембраны клеток. Данное ограничение удается преодолеть с использованием электронной микроскопии, однако в этом случае специфика пробоподготовки образцов переводит клетки в состояние далекое от нативного [12]. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) сочетает в себе достоинства оптической и электронной микроскопии и позволяет изучать ультраструктуру мембраны клеток в их прижизненном состоянии [2, 8].

Последнее десятилетие наряду с обычным визуальным анализом микроскопических оптических изображений применяют методы качественного и количественного анализа изображений клеток и бактерий, полученных сканирующей зондовой микроскопией (СЗМ). Ведь именно методы СЗМ позволяют получать не только на качественном уровне двух- и трехмерные изображения и сведения об особенностях строения поверхностной цитомембраны, но и на количественном уровне приобрести

некоторые числовые показатели, используя разнообразные методики математической обработки и интерпретации [13, 14]. Так же АСМ позволяет успешно исследовать и анализировать структуры поверхностей на молекулярном уровне, характер сорбции и конформацию различных веществ на атомарно ровной поверхности и характеризовать локальные свойства поверхностей, а именно: степень заполнения, толщину слоя и форму адсорбированных биополимеров [15-17].

На протяжении многих лет с помощью методов оптической микроскопии активно исследуется действие димефосфона *in vitro* на морфометрические и физические свойства морфологических срезов и клеток в целом [7, 18-24]. Однако вопрос о действии димефосфона на тимус, а именно на клетки тимоциты, практически не изучен [7, 18-24], тем более методами сканирующей зондовой микроскопии. Так же до сих пор до конца остается не ясным изменение физико-химических свойств лекарственного препарата димефосфон в зависимости от его концентрации [20]. В связи с этим изучение физико-химических свойств димефосфона, влияющих на адсорбцию и дальнейшее взаимодействие с поверхностью клетки и внутриклеточными структурами, представляется весьма перспективным.

Поэтому **актуальность** данной работы заключается в исследовании влияния димефосфона на клетки тимоциты *in vitro* и изучение адсорбированной пленки димефосфона на различных наноразмерных поверхностях на границе раздела фаз методами сканирующей зондовой микроскопии, результаты которых можно будет в дальнейшем использовать как модель действия лекарственного препарата на клеточную мембрану и на тимус в целом.

Таким образом, **целью** нашей работы является исследование влияния димефосфона разной концентрации на структуру и физические свойства мембраны клеток методами сканирующей зондовой микроскопии.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**.

1. Разработать комплексную методику исследования влияния лекарственного препарата ДМФ на клеточную мембрану тимоцитов методами сканирующей зондовой микроскопии.

2. Исследовать методами сканирующей зондовой микроскопии морфометрические параметры клеток, выявить в динамике изменения поверхностной структуры мембраны клеток под действием лекарственного препарата димефосфона в различных концентрациях: 7% и 15%, 0,1% и 0,2%;

3. Оценить мембраностабилизирующее действие разной концентрации димефосфона на тимоциты при разных временах воздействия ДМФ и разном времени инкубации в питательной среде после декапитации крыс.

4. Исследовать адсорбцию молекул ДМФ разной концентрации на подложках с разными физико-химическими свойствами и рассмотреть данную систему в качестве модели супрамолекулярной наноразмерной системы на границе раздела фаз;

Работа будет представлена полностью, только после публикации полученных результатов.