

Министерство образования и науки РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СИЛИКАТНЫХ И  
УГЛЕРОДНЫХ ГРУПП НАНОМАТЕРИАЛОВ НА КЛЕТКИ  
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Работа завершена:

" 31 " ноя 2018 г.  (И.Р. Ишмухаметов)

Работа допущена к защите:

Научные руководители  
к.б.н., с.н.с.,

" 1 " января 2018 г.  (Э.В. Рожина)

д.б.н., г.н.с.,

" 1 " января 2018 г.  (Р.Ф. Фахруллин)

Заведующий кафедрой  
д.б.н., профессор,

" 5 " 06 2018 г.  (О.Н. Ильинская)

Казань-2018

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	8
1.1 Применение наноматериалов в биологии	8
1.2 Характеристика силикатных и углеродных наноматериалов трубчатой и планарной формы	9
1.2.1 Каолин	9
1.2.2 Нанотрубки галлуазита	11
1.2.3 Семейство графеновых наноматериалов	13
1.2.4 Углеродные нанотрубки	14
1.3 Влияние наноматериалов на модели <i>in vitro</i>	17
1.3.1 Механизм поглощения наноматериалов клетками	17
1.3.2 Цитотоксичность наноматериалов	19
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	22
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	22
2.1 Материалы	22
2.2 Клеточная культура	22
2.3 Определение размера и поверхностного заряда наночастиц	22
2.4 Микроскопия наночастиц и клеток	23
2.4.1 Атомно-силовая микроскопия	23
2.4.2 Усиленная темнопольная микроскопия	23
2.5 Определение токсического влияния наноматериалов на клетки	24
2.5.1 MTS-тест	24
2.5.2 Проточная цитофлуориметрия	24
2.5.3 Метод ДНК-комет	25
2.5.4 Статистический анализ	26
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ</b>	27
3.1 Характеристика наночастиц	27
3.2 Визуализация сорбции наночастиц клетками	30

3.3	Определение жизнеспособности клеток после воздействия наночастиц	33
3.3.1	MTS-тест	33
3.3.2	Проточная цитофлуориметрия	34
3.4	Оценка повреждений ДНК, после инкубации с наноматериалами	36
<b>4</b>	<b>ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ</b>	<b>39</b>
	<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>45</b>
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	<b>46</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Нанотехнология является одной из самых быстро развивающихся областей научных исследований. Причина этого - наличие множества потенциальных способов применения наночастиц: направленная доставка лекарств для борьбы с раком, тканевая и клеточная инженерия, создание бактерицидных агентов [Singh, Nalwa, 2011]. Это лишь часть возможностей использования наноразмерных частиц, разработка и исследование которых активно ведётся в данный момент. Кроме того, наноматериалы применяются в косметологии, строительстве и создании микропроцессоров [Chaudhary *et al.*, 2013; Rai *et al.*, 2012]. Словом, нанотехнологии прочно вошли в нашу жизнь, и их влияние в самых разных областях со временем только возрастает.

Одна из особенностей, которая делает наночастицы столь привлекательными в медицине и прочих отраслях – это размерный эффект, придающий наноматериалам свойства нетипичные для высокодисперсных веществ. Из этого вытекает множество преимуществ: способность проникать сквозь различные мембраны, такие как гематоэнцефалический барьер; высокий показатель адсорбции веществ и возможность связываться с лекарственным препаратом, белком или другим, интересующим нас объектом [Gatoo *et al.*, 2014]. Однако для эффективного применения наноматериалов в медицине необходимы комплексные исследования, направленные на определение цитотоксичности и на выяснение механизма попадания частиц в клетки и характера их воздействия.

В данной работе исследовались четыре типа наноматериалов из двух различных групп: силикатной и углеродной. К силикатной группе наночастиц относятся – каолин и нанотрубки галлуазита. Оксид графена и углеродные нанотрубки, в свою очередь являются частицами углеродного происхождения. Помимо разницы в происхождении, наночастиц каолина и оксида графена обладают пластинчатой структурой, в то время как нанотрубки галлуазита и углерода имеют стержневую форму. Использование в исследовании глинистых наноматериалов естественного происхождения, в сравнении

углеродным, созданным посредством синтеза, позволяет оценить различие в характере клеточного ответа на природные наноструктуры и синтезированные. Кроме того, применение химически однородных, но различающихся по структуре, оксида графена и углеродных нанотрубок, а также каолина и нанотрубок галлуазита, позволит определить влияние формы на свойства и характер взаимодействия материалов с клетками.

Существующие исследования по определению степени влияния углеродных и силикатных наночастиц на клетки, по большей части являются противоречивыми [Maisanaba *et al.*, 2015; Kobayashi *et al.*, 2017]. Это следствие наличия множества факторов, косвенно или напрямую, влияющих на получаемые результаты: метод синтеза наночастиц, их размер, степень дисперсности, структура и чистота использованных компонентов [Shin *et al.*, 2015]. В связи с этим, необходимо тщательно анализировать уже имеющиеся данные и как можно более полно охарактеризовать исследуемые наночастицы.

Использование клеточных культур имеет большое значение в первичной оценке токсичности веществ. Такая оценка дает понимание о механизмах влияния на проницаемость клеточной мембраны, на угнетение метаболических параметров, таких как пролиферация или ферментативная активность. На основе таких показателей можно сформировать представление о базовых эффектах наночастиц, и соответственно снизить возможность проявления неблагоприятных ситуаций при, финансово более затратных, испытаниях на животных и человеке.

Основной целью данной работы является комплексное исследование влияния силикатной и углеродной групп наноматериалов на клетки млекопитающих, на примере клеточной культуры аденокарциномы легкого человека A549.

Задачами для поставленной цели являются:

- 1) Определение физических параметров наноматериалов и их визуализация с применением двух видов микроскопии.

- 2) Сравнительное исследование сорбции наноматериалов с планарной и трубчатой морфологией с применением атомно-силовой и усиленной темнопольной видов микроскопии.
- 3) Определение цитотоксического влияния и степени повреждений ДНК у клеток человека после инкубации с исследуемыми наночастицами.

## РЕФЕРАТ

Активное развитие нанотехнологии привело к исследованию возможности использования наноматериалов в области биомедицины: целевая доставка лекарственных препаратов, генная и клеточная инженерии. Однако для полной и безопасной реализации всего потенциала использования наноматериалов в медицине, необходимо обширное изучение механизма и степени их влияния на *in vivo* и *in vitro* модели.

В данной работе были исследованы четыре типа наноматериалов: каолин и нанотрубки галлуазита, относящиеся к силикатной группе, а также оксид графена и углеродные нанотрубки, относящиеся к углеродной группе. Каолин и оксид графена обладают планарной формой, в то время как нанотрубки галлуазита и углерода – трубчатой. Таким образом, мы исследовали влияние на клетки как формы материала, так и химического состава.

Первым делом были определены гидродинамические показатели наночастиц, такие как размер и дзета-потенциал. Зная дзета-потенциал можно судить о стабильности раствора наночастиц: обладают ли частицы в растворе тенденцией к образованию связей между друг другом и соответственно будут ли агрегировать. Было выявлено, что углеродные нанотрубки имеют слабый отрицательный потенциал (до -30 мВ), что говорит о возможной нестабильности данного коллоидного раствора. Размер наноматериалов говорит нам о степени дисперсности раствора. В данном случае, все образцы достаточно однородны.

С помощью атомно-силовой микроскопии была выявлена морфология и сила адгезии частиц. Сила адгезии – это сила, которую необходимо приложить для разрыва связи между зондом микроскопа и областью контакта его контакта с образцом. Здесь также подтверждается положение о том, что углеродные нанотрубки имеют тенденцию к агрегации: образец с трубками образует сильную связь с зондом (37 нН). Методом усиленной темнопольной микроскопии выявлена характерная структура для каждого типа

наноматериала. Также, с помощью УСМ были записаны спектры частиц, которые в последующем будут использованы для картирования наноматериалов в клетках.

Методами атомно-силовой микроскопии клеток выявлена морфология и сила адгезии клеток, обработанных наноматериалами. На поверхности клеток хорошо различимы исследуемые наночастицы. Кроме того, добавление наночастиц повысило адгезию клеточной поверхности, что говорит о влиянии материалов на вязкость клеточной мембраны. С помощью усиленной темнопольной микроскопии клеток было показано проникновение наноматериалов в клетки A549.

Токсическое влияние определялось с помощью трёх методов: метода проточной цитофлуориметрии, метода ДНК-комет и MTS-теста. По результатам MTS-теста на определение метаболической активности определено, что при суточной инкубации наноматериалов с клетками, проявляется явный дозозависимый токсический эффект. В целом, глинистые наноматериалы оказывали менее пагубное влияние, относительно углеродных. Форма наноматериалов слабо влияет на метаболическую активность. В случае с оксидом графена не было получено результатов с концентрациями более 100 мкг/мл из-за сильной адсорбции реагента наноматериалом. По данным проточной цитофлуориметрии явного токсического эффекта, вызванного наноматериалами силикатной группы, обнаружено не было - жизнеспособность клеток сохранилась на уровне контрольной группы. В случае с материалами углеродного типа, сильное влияние оказывает форма и размер наночастиц: наиболее токсичным оказался оксид графена с самым большим размером частиц, в то время как углеродные нанотрубки не оказали на жизнеспособность клеток ощутимого воздействия. Результаты метода ДНК-комет показали высокий уровень разрушения ДНК в случае инкубации клеток с углеродными наноматериалами: в результатах этих образцов, присутствуют группы клеток с умеренным, значительным и даже максимальным уровнем повреждений ДНК. В то время, как силикатные, при



той же концентрации, увеличили лишь долю клеток со слабыми и умеренными повреждениями.

## **ВЫВОДЫ**

- 1) Получена гиперспектральная библиотека для исследуемых наноматериалов, которая в последующем может быть использована для картирования наночастиц в клетках. Определены физические показатели наночастиц в виде размера, поверхностного потенциала, силы адгезии. Визуализирована структура наноматериалов посредством двух видов микроскопии.
- 2) С помощью атомно-силовой и усиленной темнопольной видов микроскопии визуализировано поглощение наночастиц планарной и трубчатой формы клетками A549.
- 3) Определена степень токсического влияния нанотрубок галлуазита, каолина, оксида графена и углеродных нанотрубок на клетки A549, посредством MTS-теста, проточной цитофлуориметрии и метода ДНК-комет. Выявлено, что более токсичными для клеток являются наночастицы углеродной группы, а именно – оксид графена.