

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Изменение свойств мембран эритроцитов под действием  
наночастиц**

**АВТОРЕФЕРАТ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ  
БАКАЛАВРА**

Студентки 4 курса 434 группы  
Направления 03.03.02 «Физика»  
Физического факультета  
Доронкиной Анны Алексеевны

Научный руководитель

Доцент, к.х.н.  
должность, уч. ст., уч. зв.

  
27.06.2017  
личная подпись, дата

А.Б.Правдин  
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

Профессор, д. ф.-м.н.  
должность, уч. ст., уч. зв.

  
личная подпись, дата

Тучин В. В.  
инициалы, фамилия

Саратов 2017

### Список используемых источников

1. Leonard I. Grossweiner. Photosensitization of Red Blood Cell hemolysis: A brief review. 1999, Сайт «Internet Photochemistry&Photobiology. An international forum for virtual conferences». <http://www.photobiology.com/reviews/5/index.htm> (17.05.2017).
2. Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q. Photodynamic Therapy. Journal of the National Cancer Institute, V.90, I. 12, 1998, p. 889-905.
3. Патент РФ 2002132213/15, 20.11.2002. Белоусова И.М, Белоусов В.П, Пиотровский Л.Б, Мак А.А, Пономарев А.Н. Способ фотодинамического воздействия на вирусы и клетки // Патент Россия №2291700С2. 20.01.2007 Бюл. №2.
4. Горюнов А. С., Борисова А. Г. Морфология и агрегация эритроцитов в нанодисперсиях углерода. Труды Карельского научного центра РАН Петрозаводск, № 3, 2009, с. 30–37.
5. Борисова А.Г. Влияние гидратированных фуллеренов C60 на морфологию эритроцитов человека по данным электронной микроскопии. Углеродные наночастицы в конденсированных средах, 2006, с. 212-217.
6. Матюхина Т. Г., Комков О. Ю., Чижик С. А. Асм-исследование клеток сердечно-сосудистой системы и крови. Проблемы и надежды. БелСЗМ-4, 2000, с.44-47.
7. Матюхина Т. Г., Пантелей С. О., Кузнецова Т. А.. Атомно-силовая микроскопия эритроцитарных мембран. БелСЗМ-6, г. Минск, 2004 г., с. 97-101.
8. Лобов И.А., Давлеткильдеев Н.А. Влияние способа подготовки образца на морфофункциональные характеристики эритроцитов при исследовании методом атомно-силовой микроскопии. Вестн. Ом. ун-та. № 2, 2013, с. 129–132.

27.06.2017 *Роберт*

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра оптики и биофотоники

**Изменение свойств мембран эритроцитов под действием  
наночастиц**

**АВТОРЕФЕРАТ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ  
БАКАЛАВРА**

Студентки 4 курса 434 группы  
Направления 03.03.02 «Физика»  
Физического факультета  
Доронкиной Анны Алексеевны

Научный руководитель

Доцент, к.х.н.

должность, уч. ст., уч. зв.

Зав. кафедрой

Профессор, д. ф.-м.н.

должность, уч. ст., уч. зв.

личная подпись, дата

личная подпись, дата

А.Б.Правдин

инициалы, фамилия

Тучин В. В.

инициалы, фамилия

Саратов 2017

**Введение.** В последние годы одними из лидирующих по смертности болезней являются онкологические заболевания. Существуют множество способов лечения данных заболеваний, среди которых можно отметить химиотерапию, лучевую терапию, хирургическое лечение, фотодинамическую терапию. В основе действия последней лежит комплексное действие света, красителя-сенсibilизатора и кислорода [1]. Есть множество различных сенсibilизаторов, среди которых выделяются сенсibilизаторы нового поколения, представляющие собой сложные комбинированные структуры, основой которых зачастую являются различные наночастицы. К ним предъявляется ряд требований, среди которых - нетоксичность для организма, высокая способность генерировать синглетный кислород, а также малые затраты на производство [2]. В качестве фотосенсibilизаторов на основе наночастиц можно использовать сравнительно недавно синтезированные наночастицы Астралены, представляющий собой полиэдральные многослойные углеродные наноструктуры [3]. Кроме того, для повышения эффективности фотодинамического действия к гибридным наноструктурам углеродного типа – Астраленам, можно добавить известный сенсibilизатор - протопорфирин IX, что, теоретически, должно повысить квантовый выход такого комплекса.

Целью настоящей работы является наблюдение изменения морфологии мембран эритроцитов с углеродными наночастицами методом оптической микроскопии, а также разработка метода получения монослоя эритроцитов из суспензии для дальнейшего исследования мембран эритроцитов, декорированных углеродными наночастицами фуллероидного типа, методом атомно-силовой микроскопии.

Выпускная квалификационная работа состоит из введения, двух глав, заключения и списка литературы. В главе 1 «обзор состояния проблемы» проводится теоретический обзор по теме выпускной квалификационной работы. Введено понятие - сенсibilизатор, описано, какие виды наносенсibilизаторов бывают.

Во второй главе Экспериментальная часть описаны способы приготовления образцов для микроскопических исследований. В разделе «результаты и обсуждения» представлены полученные с помощью оптического светового и атомно-силового микроскопов микрофотографии, по ним рассчитана оптическая плотность, средний размер и доля эритроцитов всех образцов клеток. По данным атомно-силовой микроскопии построены 3-х мерные изображения «чистых» и декорированных наночастицами эритроцитов.

В Заключении сформулированы основные результаты и выводы.

**Основное содержание работы.** Во введении описывается актуальность работы, основные сферы применения наночастиц, поставлены основные цели выпускной квалификационной работы.

Глава 1 посвящена обзору литературы. В разделе 1.1 кратко описан принцип фотодинамического действия .

В разделе 1.2 описано, какие поколения сенсбилизаторов существует на данный момент времени, описано строение наночастиц Астраленов.

В разделе 1.3 дана историческая справка по истории развития оптической микроскопии, принцип работы атомно-силового микроскопа.

Во второй главе описывается экспериментальная часть работы. В экспериментах по оптической световой микроскопии использовалась 2,5% суспензия эритроцитов с: протопорфирином IX, гибридными наночастицами Астраленами, комплексом протопорфирин IX - наночастицы Астралены, физиологическим раствором.

В экспериментах по атомно-силовой микроскопии использовалась 1% суспензия эритроцитов с гибридными наночастицами Астраленами и физиологическим раствором.

В разделе 2.2 представлены результаты, полученные в ходе выполнения выпускной квалификационной работы. Образцы инкубировались в воздушном термостате при 37°C в течение 3 часов, при этом каждый час проводилась микрофоторегистрация «крашенных» эритроцитов. В ходе

экспериментов не наблюдались тени эритроцитов, что свидетельствует об отсутствии спонтанного лизиса эритроцитов, и, соответственно, об отсутствии темновой токсичности сенсibilизаторов.

По результатам визуального наблюдения отмечается образование большого числа агрегатов в образце, сенсibilизированном протопорфирином IX, чего не наблюдалось в образце, сенсibilизированном комплексом протопорфирин IX – Астралены.

После первого часа наблюдений происходит разъединение агрегатов эритроцитов с протопорфирином, через 3 часа агрегатов не наблюдается вовсе. Обратимость агрегации может свидетельствовать о непрочности встраивания протопорфирина IX в мембраны эритроцитов за счет изменения глубины встраивания гидрофобной молекулы протопорфирина в мембрану.

В образцах с Астраленами и комплексом за все время микрофоторегистрации агрегатов не наблюдалось. Это может быть связано с тем, что взаимодействие «наночастицы фуллероидного типа - мембрана эритроцитов» ведет к изменению полярности мембраны, в частности – к увеличению ее отрицательного заряда за счет самих гидрофобных отрицательно заряженных Астраленов [4].

По микрофотографиям были рассчитаны оптическая плотность и размер эритроцитов, а также вычислена доля эхиноцитов в общем количестве эритроцитов. Обработка фотографий проводилась в программе ImageJ (свободно распространяемое ПО).

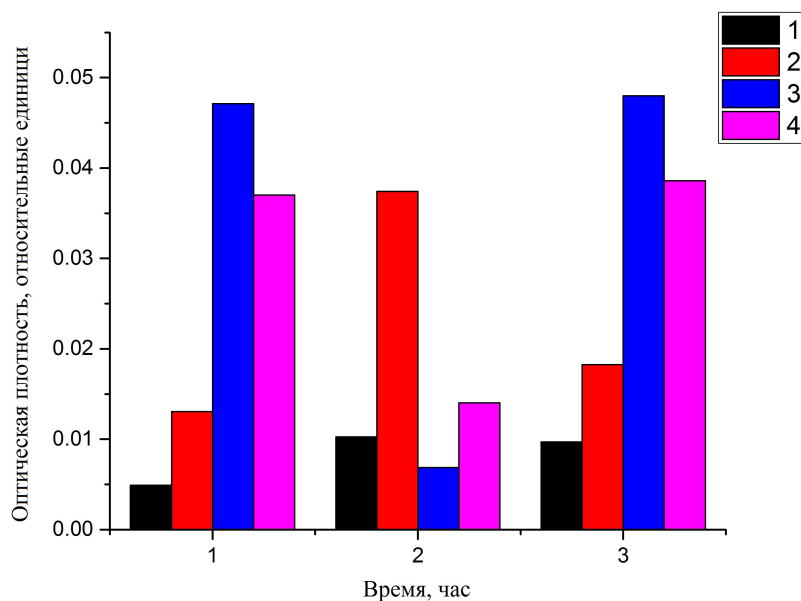


Рисунок 1. Оптическая плотность эритроцитов, декорированных 1) Физиологическим раствором, 2) протопорфирином IX, 3) гибридными наночастицами Астралены, 4) комплексом протопорфирин IX – гибридные наночастицы Астралены

По микрофотографиям и рассчитанной оптической плотности видно, что связывание комплекса протопорфирин IX – гибридные Астралены с мембраной эритроцитов полностью проходит в течение первого часа инкубации, после чего процесс прекращается в связи с максимальным «насыщением» мембраны наночастицами. Из представленных на Рисунке 1 данных видна значительная разница оптической плотности протопорфирин IX и образцов с Астралены. Это объясняется, во-первых, тем, что для связывания протопорфирин IX с мембранными липидами требуется значительно больше времени, чем в случае образцов с Астралены. Кроме того, видна разница в оптической плотности между образцами с Астралены и образцами с комплексом, что может являться проявлением взаимодействия наночастиц с примембранным цитоскелетом.

Во-вторых, отмечается уменьшение размеров эритроцитов с адсорбированными гидрофилизированными Астралены и комплексом по сравнению с протопорфирином IX и контрольным образцом,

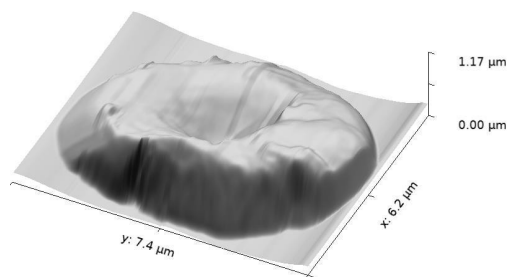
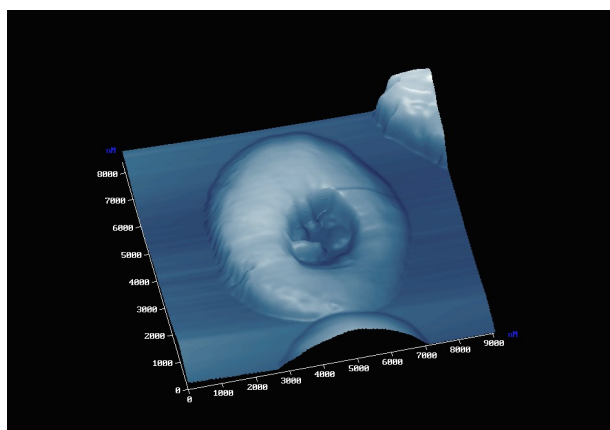
сопровождающееся появлением эхиноцитов, и, как следствие, увеличением оптической плотности образцов.

Изменение размеров эритроцитов является следствием появления эхиноцитов. Изменение размеров эритроцитов и появление эхиноцитов при взаимодействии эритроцитов с наночастицами фуллероидного типа (коими являются Астралены) в литературе связывают с тем, куда – во внешний или во внутренний слой мембраны встраивается молекула фуллерена [5]. При этом в нашем случае, скорее всего, гибридные наночастицы встраиваются в наружный слой мембраны, что может приводить к ее структурным изменениям за счет перераспределения липидов в мембране. Встраивание наночастиц в мембрану с ее последующим растяжением приводят к появлению выростов и формированию эхиноцитов. Кроме того, на изменение формы клеток может влиять увеличение электроотрицательности мембраны, при этом сопровождающееся повышением лабильность эритроцитов, предположительно, за счет уменьшения адгезии эритроцитов к стеклу в результате возрастания поверхностного отрицательного заряда. Наличие большого количества эхиноцитов в образцах с протопорфирином IX объясняется наличием крупных агрегатов, которые затрудняют правильный подсчет клеток разных типов по микрофотографиям.

Для проведения экспериментов на атомно-силовом микроскопе (АСМ) был разработан метод получения монослоя, который позволяет изучать образцы клеток, полученных не из мазка крови, а из суспендированного раствора, что дает больше возможностей для изучения модельных сред при проведении экспериментов *in vitro*. Сканирование для получения изображения с высоким разрешением занимает длительное время, но при данной методике приготовления образцов исследуемые клетки остаются не разрушенными и не меняющими свою исходную морфологию достаточно долгое время, чего невозможно достичь при создании образца клеток методом мазка [6-8].



В ходе проведения экспериментальной работы был освоен атомно-силового микроскоп. По 3-х мерным АСМ-изображениям можно детально оценить структуру поверхности мембраны. По результатам экспериментов были получены изображения в контактном режиме сканирования «чистых» эритроцитов и эритроцитов, декорированных наночастицами Астраленами (Рисунок 2).



а) б)  
Рисунок 2. АСМ-изображение при сканировании в контактном режиме эритроцитов: а) «чистого», б) декорированного наночастицами Астраленами

По 3D-изображениям эритроцитов с адсорбированными гибридными наночастицами видны выросты, свидетельствующие о формировании эхиноцитов, за счет, предположительно, встраивания наночастиц в мембрану с ее последующим растяжением.

По графикам волнистости и шероховатости можно оценить морфологию поверхности мембраны. Видно, что на поверхности мембран «чистых» клеток встречаются регулярные выступы, как в углублении, так и на вершине, позволяющие предположить, что они являются белковыми комплексами, включенными в состав эритроцитарной мембраны.

В статье Матюхиной Т.Г. выдвинуто предположение, что выступы в центральном углублении обеспечивают агрегацию эритроцитов в «монетные столбики» при перемещении в центральном потоке крови внутри сосудов [7]. Однако, по графику волнистости видно, что при адсорбции наночастиц на

поверхность мембраны центральное углубление имеет более сглаженный вид, чем у «чистых» эритроцитов. Полученные результаты согласуются с тем, что наблюдалось с оптического светового микроскопа, где не наблюдалось агрегатов в образце с углеродными наночастицами.

**Заключение.** В ходе выполнения данной выпускной квалификационной работы проводилось наблюдение взаимодействия мембран эритроцитов с углеродными наночастицами методами оптической и атомно-силовой микроскопии.

По результатам данной работы можно сделать выводы:

- Отсутствие теней эритроцитов свидетельствует об отсутствии темнового гемолиза;
- Увеличение лабильности эритроцитов с Астраленами говорит о уменьшении адгезии эритроцитов к стеклу;
- Для связывания протопорфирином IX с мембранами эритроцитов нужно больше времени, чем Астраленам;
- Уменьшение размеров эритроцитов с Астраленами сопровождается появлением эхиноцитов;
- Отмечено отсутствие агрегатов в образцах с Астраленами;
- По АСМ-изображениям можно сделать предположение, что формирование эхиноцитов за счет того, что наночастицы Астралены встраиваются в наружный слой мембраны, что может приводить к ее структурным изменениям.

На основе этих выводов можно заключить, что наночастицы встраиваются в мембрану эритроцитов, изменяют их форму, а так же влияют на естественную агрегацию крастных клеток крови.

## Список используемых источников

1. Leonard I. Grossweiner. Photosensitization of Red Blood Cell hemolysis: A brief review. 1999, Сайт «Internet Photochemistry&Photobiology. An international forum for virtual conferences». <http://www.photobiology.com/reviews/5/index.htm> (17.05.2017).
2. Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q. Photodynamic Therapy. Journal of the National Cancer Institute, V.90, I. 12, 1998, p. 889-905.
3. Патент РФ 2002132213/15, 20.11.2002. Белоусова И.М, Белоусов В.П, Пиотровский Л.Б, Мак А.А, Пономарев А.Н. Способ фотодинамического воздействия на вирусы и клетки // Патент Россия №2291700С2. 20.01.2007 Бюл. №2.
4. Горюнов А. С., Борисова А. Г. Морфология и агрегация эритроцитов в нанодисперсиях углерода. Труды Карельского научного центра РАН Петрозаводск, № 3, 2009, с. 30–37.
5. Борисова А.Г. Влияние гидратированных фуллеренов C<sub>60</sub> на морфологию эритроцитов человека по данным электронной микроскопии. Углеродные наночастицы в конденсированных средах, 2006, с. 212-217.
6. Матюхина Т. Г., Комков О. Ю., Чижик С. А. Асм-исследование клеток сердечно-сосудистой системы и крови. Проблемы и надежды. БелСЗМ-4, 2000, с.44-47.
7. Матюхина Т. Г., Пантелей С. О., Кузнецова Т. А.. Атомно-силовая микроскопия эритроцитарных мембран. БелСЗМ-6, г. Минск, 2004 г., с. 97-101.
8. Лобов И.А., Давлеткильдеев Н.А. Влияние способа подготовки образца на морфофункциональные характеристики эритроцитов при исследовании методом атомно-силовой микроскопии. Вестн. Ом. ун-та. № 2, 2013, с. 129–132.