

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

**Исследование антиоксидантов и наночастиц, влияющих на изменение  
состояния мембран эритроцитов**

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ ПОДГОТОВЛЕННОЙ  
НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ (ДИССЕРТАЦИИ)

аспиранта 4 года обучения

направление подготовки 06.06.01 – «Биологические науки»

физического факультета

Ткаченко Натальи Валерьевны

Научный руководитель  
заведующий кафедрой ОиБФ,  
профессор, д. ф.-м. н.

\_\_\_\_\_ В.В. Тучин

Саратов 2018

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Эритроциты – удобный и повсеместно используемый объект для исследования мембран клеток. Изменения свойств их мембран при взаимодействии с внешними агентами очень часто ведет к ухудшению их физиологических характеристик, в частности, морфореологических показателей, что делает эритроциты весьма привлекательными для тестирования действия новых биологических и синтетических соединений, предназначенных для клинического применения. Такими соединениями могут быть агенты для транспортной доставки лекарства к органу, сенсibilизаторы для фотодинамической терапии онкологических заболеваний, антиоксидантные и прооксидантные системы и др.

Для исследования новых сенсibilизаторов и антиоксидантов представляется удобным использовать модель фотодинамического гемолиза эритроцитов, являющимся следствием фотоиндуцированного повреждения клеток в ходе фотодинамического действия. Для протекания последнего требуется наличие трёх основных факторов: излучения, красителя-сенсibilизатора и кислорода, сенсibilизированного введенными в клетки или организм хромофорами. Так как фотодинамическое воздействие является, по своей сути, фотоокислением, то удобно использовать антиоксиданты в качестве мембранопротекторов при фотодинамическом действии. Мерой эффективности такого действия, и, следовательно, мерой эффективности антиоксидантного действия исследуемого вещества, будет являться его способность снижать «тяжесть» фотодинамического повреждения мембран эритроцитов при облучении, которая коррелирует со скоростью темнового гемолиза, то есть, со скоростью лизиса клеток после облучения. В качестве антиоксидантов представляется эффективным использование растительного сырья, которое обладает высокой биосовместимостью. Такими антиоксидантами могут стать экстракты флавоноидосодержащих растений, произрастающих на территории Саратовской

области: Аврана лекарственного (*Gratiola officinalis L.*), Бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium (L.) Moench*) и Антоциановой формы кукурузы *Zea mays L.* линии Пурпурная Саратовская, которые были получены по разработанной и запатентованной сотрудниками Саратовского государственного медицинского университета методике, с помощью которой возможно получение нетоксичных БАК из ядовитых растений.

Модель фотодинамического гемолиза кроме изучения действия различных антиоксидантов удобна и для тестирования новых сенсibilизаторов, так как они являются одним из необходимых компонентов фотодинамического действия. Существует огромное количество сенсibilизаторов как природного, так и синтетического происхождения, при этом постоянно продолжается поиск новых сенсibilизирующих агентов. Это обусловлено тем, что к сенсibilизаторам предъявляется ряд требований, среди которых - нетоксичность для организма и малые затраты на производство. Таким сенсibilизатором может стать комплекс гибридных наночастиц, состоящий из гидрофобных Астраленов и водорастворимых аддуктов нанокластеров углерода Астрален-С, к главным достоинствам которого относится высокая эффективность генерирования синглетного кислорода при облучении светом и, в то же время, не токсичность для организма и отсутствие распада на токсичные составляющие.

**Цель работы** состоит в оценке эффективности мембранопротекторного действия трех растительных флавоноидосодержащих экстрактов: Аврана лекарственного (*Gratiola officinalis L.*), Бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium (L.) Moench*) и Антоциановой формы кукурузы *Zea mays L.* линии Пурпурная Саратовская по их способности ингибировать фотодинамический гемолиз эритроцитов, а также в оценке эффективности в качестве сенсibilизатора фотодинамического действия углеродных наночастиц фуллероидного типа Астраленов.

Для реализации поставленных целей необходимо решить следующие **задачи**:

1. Адаптировать применяемую в лабораториях кафедры методику фотодинамического гемолиза к задаче изучения ингибирования фотодинамического процесса растительными антиоксидантами
2. Исследовать протекторные свойства растительных экстрактов при различных условиях проведения экспериментов.
3. Исследовать механизм фотодинамический гемолиз, сенсibilизированный углеродными наночастицами Астраленами при различных условиях проведения экспериментов.
4. Разработать и апробировать метод приготовления монослоя эритроцитов, который позволял бы изучать образцы, полученные не из мазка клеток, а из суспендированного раствора для исследования микроскопическими методами в течение длительного промежутка времени
5. Различными микроскопическими методами исследовать влияние углеродных наноструктур на морфореологические свойства мембран эритроцитов.

**Объектами исследований** являются эритроциты белой лабораторной крысы, подвергающиеся действию внешних агентов: растительных флавоноидосодержащих антиоксидантов - Аврана лекарственного (*Gratiola officinalis L.*), Бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium (L.) Moench*) и Антоциановой формы кукурузы *Zea mays L.* линии Пурпурная Саратовская, углеродных наночастиц фуллероидного типа в виде гибридных наночастиц из гидрофобных Астраленов и водорастворимых аддуктов нанокластеров углерода Астрален-С (ВААС), комплекса протопорфирин IX – гибридные углеродные наноструктуры на основе Астраленов.

**Предмет исследования:**

- ингибирование фотодинамического гемолиза эритроцитов растительными флавоноидосодержащими антиоксидантами и их отдельными компонентами;
- фотодинамическое повреждение мембран эритроцитов под действием гибридных углеродных наночастиц;

- темновое воздействие гибридных углеродных наночастиц и комплекса на их основе на мембраны эритроцитов.

### **Теоретическая и методологическая основы исследований**

Эффективность ингибирования фотодинамического гемолиза и эффективность действия сенсibilизаторов на основе углеродных наночастиц оценивалась по предложенной Л. Гроссвайнер методике сравнения времени гемолизации 50% эритроцитов для различных сенсibilизаторов согласно коллоидно-осмотической модели фотодинамического гемолиза Пуллера. Для микроскопических исследований использовалась авторская методика приготовления образцов. Полученные результаты обрабатывались с помощью программ OriginPro 8, Gwyddion (свободно распространяемое ПО).

### **Обоснованность и достоверность результатов исследований**

Достоверность полученных результатов определяются точностью используемых методов измерений, выбранной моделью оценки фотодинамического повреждения мембран, согласованностью полученных данных с имеющимися теоретическими и экспериментальными результатами, опубликованными в ведущих отечественных и зарубежных изданиях, широкой апробацией результатов работы на Российских и международных конференциях.

### **Научная новизна работы**

1. Впервые с помощью методики фотодинамического гемолиза исследованы на наличие антиоксидантного (мембранопротекторного) действия новые растительные флавоноидосодержащие экстракты.

2. Впервые исследовался механизм фотосенсibilизирующего действия углеродных наноструктур Астраленов на эритроциты.

3. В ходе экспериментов по сенсibilизированному наночастицами Астраленами фотодинамическому гемолизу впервые был рассчитан феноменологический показатель степени  $k = 4.02 \pm 0.01$  для данного сенсibilизатора.

4. Был разработан и апробирован метод приготовления монослоя эритроцитов с нанесенными наночастицами, который позволяет изучать образцы,

полученные не из мазка клеток, а из суспендированного раствора для исследования микроскопическими методами в течение длительного промежутка времени.

5. Методами цифровой голографической, оптической и атомно-силовой микроскопии впервые исследовалось взаимодействие Астраленов с мембранами эритроцитов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные сведения о антиоксидантном действии исследованных растительных антиоксидантов в пределах использованных концентраций служат теоретическим и практическим обоснованием для их последующего фармакологического изучения как источников возможного торможения перекисного окисления мембранных липидов человека.

Данные по фотосенсибилизирующему действию углеродных наноструктур могут послужить основой для возможного будущего использования данных структур в качестве сенсibilизаторов для фотодинамической терапии онкологических заболеваний.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Экстракт Аврана лекарственного и экстракт Бессмертника песчаного обладают мембранопротекторной (антиоксидантной) активностью. Высокие концентрации растительных флавоноидосодержащих экстрактов снижают резистентность эритроцитов к фотодинамическому повреждению.

2. Сенсибилизированный гибридными наночастицами на основе Астраленов фотогемолиз эритроцитов происходит по коллоидно-осмотическому механизму.

3. Темновое взаимодействие гибридных наночастиц Астраленов с мембранами эритроцитов приводит к формированию эхиноцитов.

### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены на 13 международных и Российских конференциях: International Workshop «Structure and Functions of Biomembranes» (Москва-Долгопрудный, Россия, 2014), Международная школа для студентов и молодых ученых по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting»

(Саратов, Россия, 2014, 2015, 2016, 2017), Взаимодействие сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами (Саратов, Россия, 2015, 2018), The 43rd Annual meeting of the international society on oxygen transport to tissue "ISOTT-2015" (Wuhan, China, 2015), XIII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике (Самара, Россия, 2015), Всероссийская молодежная научная школа-конференция «Практическая биофизика» (Саратов, Россия, 2015), Всероссийская научная школа-семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине» (Саратов, Россия, 2016, 2017), SPIE Photonics West 2018 (San Francisco, USA, 2018).

### **Структура работы**

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения и списка литературы. Объем диссертации составляет 119 страниц, включая список литературы, 39 рисунков и 1 таблицу. Список цитированной литературы содержит 198 наименований, включая публикации автора по теме диссертации.

В первой главе произведен обзор литературы по морфореологическим свойствам эритроцитов, растительным антиоксидантам, наночастицам как агентам фотодинамического действия и атомно-силовой микроскопии клеток. Рассматриваются особенности строения мембран эритроцитов, существующие теории агрегации клеток крови. Анализируются основные методы исследований антиоксидантной активности и некоторые существующие растительные антиоксиданты. Отдельно рассматриваются растительные флавоноидосодержащие антиоксиданты, особое внимание уделяется трем созданным запатентованным методом экстракции сотрудниками Саратовского государственного медицинского университета растительным антиоксидантам, полученным из флавоноидосодержащих трав, произрастающих на территории Саратовской области: Аврану лекарственному (*Gratiola officinalis* L.), Бессмертнику песчаному (*Helichrysum arenarium* (L.) Moench) и Антоциановой формы кукурузы *Zea mays* L. линии Пурпурная Саратовская.

В разделе, посвященном наночастицам как агентам для фотодинамического действия рассматриваются три основных поколения сенсibilизаторов, особое внимание уделяется третьему поколению и, конкретно, сенсibilизаторам на основе различных наночастиц, описываются основные особенности фуллеренов и Астраленов.

В разделе, посвященном атомно-силовой микроскопии клеток, описываются основные принципы работы атомно-силового микроскопа, Рисунок 1.

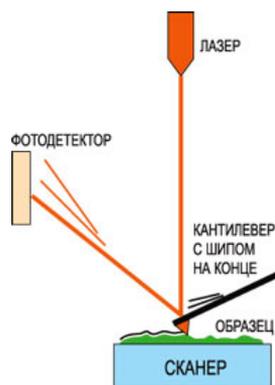


Рисунок 1. Принцип работы атомно-силового микроскопа

Отмечается, что в зависимости от условий проведения эксперимента, существуют различные способы подготовки образцов для сканирования на атомно-силовом микроскопе. Для проведения АСМ-исследования клеток на воздухе, клетки высушивают без или после предварительной обработки химическими агентами (например, альдегидами и спиртами). Клетки могут быть зафиксированы различными способами: химическими агентами, высушиванием или замораживанием. В жидких средах исследуют клетки в нативном состоянии или после слабой химической фиксации (например, разбавленным раствором глутарового альдегида).

Вторая глава посвящена исследованию ингибирования растительными флавоноидосодержащими антиоксидантами фотодинамического гемолиза. Эффективность антиоксидантного действия растительных флавоноидосодержащих экстрактов определялась по их способности ингибировать фотодинамическое повреждение мембран эритроцитов в ходе сенсibilизированного фотодинамического гемолиза.

Экстракты растительных флавоноидосодержащих антиоксидантов были получены от сотрудников Саратовского государственного медицинского университета им. В.И. Разумовского. Использовались концентрации: экстракт Аврана лекарственного (*Gratiola officinalis L.*): 250, 125, 62.5, 31.25, 15.5 мг/мл; раствор Кверцетина (концентрация пересчитывалась на соответствие аналогичного содержания в экстракте Аврана лекарственного, где среднее количество кверцетина по данным хроматографического анализа составляло 0,66%): 0.023, 0.012, 0.0058 мг/мл; раствор галловой кислоты (среднее количество галловой кислоты в экстракте Аврана лекарственного по данным хроматографического анализа составляло 26%): 0.27, 0.135, 0.07 мг/мл; экстракт Бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium (L.) Moench*): 1.6, 3.2, 6.3, 12.7 мг/мл; экстракт антоциановой формы Кукурузы обыкновенной (*Zea mays*) – 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.1 мг/мл. Отмытые от плазмы эритроциты белых беспородных лабораторных крыс инкубировались с исследуемым антиоксидантом в воздушном термостате в течение 2 или 15 ч. после чего центрифугировались, по завершению дозатором снимался надосадочный слой жидкости и вместо него заливался физиологический раствор с получением 10% суспензии эритроцитов, в которую затем добавлялся сенсibilизатор Эритрозин В, после чего суспензии облучались лампой накаливания с инфракрасными фильтрами. После облучения на спектрофотометре СФ-26 измерялось пропускание образцов.

Мембранопротекторная (антиоксидантная) активность раствора экстракта оценивалась по снижению тяжести фотодинамического повреждения мембран при облучении, которая коррелирует со скоростью темнового (замедленного) гемолиза, т.е. со скоростью лизиса клеток в период после облучения. Скорость темнового гемолиза определяется по измеренной оптической плотности облученной суспензии сенсibilизированных эритроцитов. Полученные значения оптической плотности пропорциональны концентрации не гемолизированных эритроцитов в момент измерения. Полученные значения измеряемой относительной оптической плотности были нормированы таким образом, что при больших временах измерений эти значения оптической плотности

приравнивались к нулю, а значения оптической плотности образцов сразу после облучения брались за единицу. Полученные таким образом кривые характеризуют уменьшение доли не гемолизированных эритроцитов во время темновой стадии фотогемолиза и имеют сигмовидную форму подобно кривым темновой фазы фотогемолиза. Полученные экспериментальные данные аппроксимировались логистической сигмоидальной кривой, после чего определялась величина  $t_{50}$  – время лизиса 50% эритроцитов, характеризующее темновую стадию фотогемолиза и степень фотодинамического повреждения мембран: чем больше значения  $t_{50}$ , тем меньше тяжесть фотоповреждений.

Ингибирование фотодинамического гемолиза в зависимости от концентрации Аврана лекарственного: Были проведены серии экспериментов в двух различных диапазонах концентраций антиоксиданта, Рисунок 2. Для совместного анализа этих двух наборов данных была введена величина  $t_{50}$ относительное (или -  $t_{50}$ relative), которая представляет собой отношение величины  $t_{50}$ , определенной из экспериментов с различными концентрациями антиоксиданта, к  $t_{50}$ , полученной из той же серии экспериментов, но для образцов, инкубированных в физиологическом растворе. Таким образом учитывается факт, что параметры (например – качество крови), влияющие на скорость гемолиза, могут неуправляемо варьироваться от серии к серии экспериментов.

Видно, что увеличение концентрации экстракта Аврана лекарственного не увеличивает характерное время гемолиза ( $t_{50}$ относительное), т.е. не увеличивается резистентность эритроцитов. Наблюдаемое снижение резистентности мембран может быть вызвано наличием в сложном составе экстракта Аврана лекарственного компонентов, обладающих способностью уменьшать повреждения мембран, снижающих ее механическую прочность.

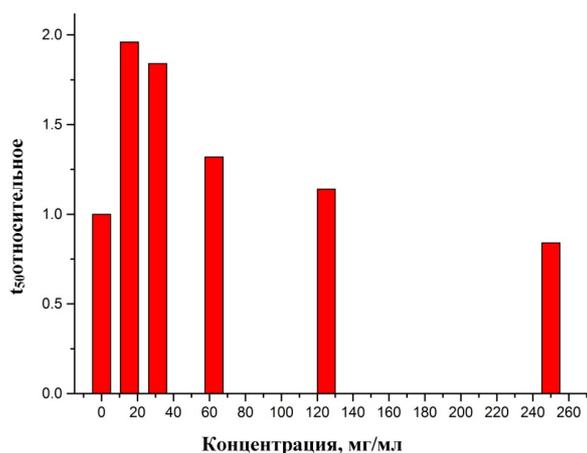


Рисунок 2. Характерное время гемолиза для различных концентраций экстракта Аврана лекарственного

Исследования влияния времени инкубации эритроцитов на скорость фотодинамического гемолиза, ингибированного Авраном лекарственным: В дополнении к данным, полученным для 2-х часовой инкубации (см. Рисунок 2), была проведена серия измерений в диапазоне низких концентраций экстракта Аврана лекарственного, но с 15-ти часовым временем инкубации, данные представлены на Рисунке 3.

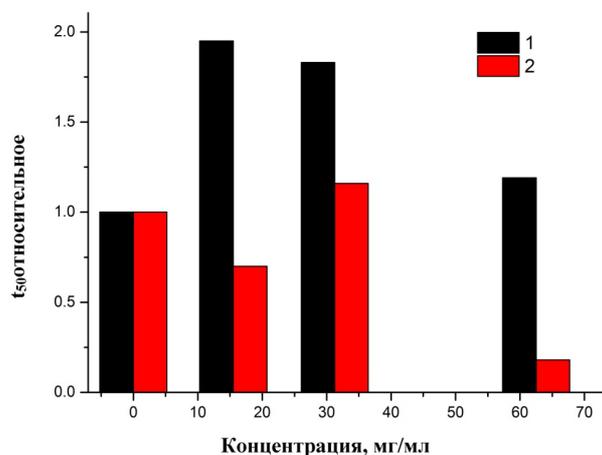


Рисунок 3. Характерное время гемолиза для разных времен инкубации с экстрактом Аврана лекарственного: 1 – 2 ч инкубации, 2 – 15 ч инкубации

Из полученных данных видно, что увеличение времени воздействия экстракта на мембраны эритроцитов (времени инкубации) значительно ухудшает устойчивость эритроцитов к фотодинамическому гемолизу.

Сравнение эффективности мембранопротекторного действия антиоксидантов Кверцетина и экстракта Аврана лекарственного: Целью данного исследования было сравнение ингибирующего (протекторного) действия растительного флавоноидосодержащего антиоксиданта экстракта Аврана лекарственного (*Gratiola officinalis*) и входящего в его состав кверцетина на фотодинамическое повреждение клеточных (эритроцитарных) мембран. На Рисунке 4 приведено сравнение величин  $t_{50\text{relative}}$  для экстракта Аврана лекарственного и кверцетина, для растворов экстракта Аврана лекарственного указаны концентрации содержащегося в них кверцетина.

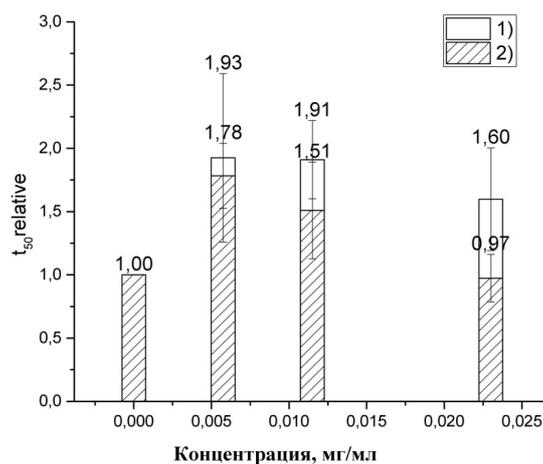


Рисунок 4. Сравнение мембранопротекторной эффективности 1) экстракта Аврана лекарственного, 2) Кверцетина

Из полученных данных виден идентичный концентрационный характер поведения мембранопротекторной активности обоих антиоксидантов, однако для суспензий, ингибированных экстрактом Аврана лекарственного, значение  $t_{50\text{relative}}$  выше. Это может говорить не только о более высокой мембранопротекторной эффективности последнего, но и о том, что кроме

кверцетина в экстракте Аврана лекарственного могут присутствовать и другие компоненты, отвечающие за его антиокислительные свойства.

Исследование антиоксидантной эффективности входящей в состав Аврана лекарственного галловой кислоты: Сложный состав экстракта Аврана лекарственного затрудняет возможность однозначно назвать компоненты, отвечающие за его мембранопротекторную (антиоксидантную) активность. По данным хроматографического анализа, одним из компонентов данного экстракта является галловая кислота (26% в весовом соотношении). Целью данного этапа экспериментов было выявление возможного вклада галловой кислоты в общую антиоксидантную активность экстракта Аврана лекарственного. Как видно из Рисунка 5, мембранопротекторное (антиоксидантное) действие наблюдается только при концентрации галловой кислоты 0.07 мг/мл и ниже. Увеличение концентрации раствора галловой кислоты не увеличивает характерное время гемолиза ( $t_{50\text{relative}}$ ), т.е. не увеличивается резистентность эритроцитов, а наоборот, усиливает скорость лизиса клеток по сравнению с контрольным образцом, инкубированным в физиологическом растворе ( $t_{50\text{relative}} < 1$ ), что согласуется с ранее полученными данными по мембранопротекторному действию Кверцетина.

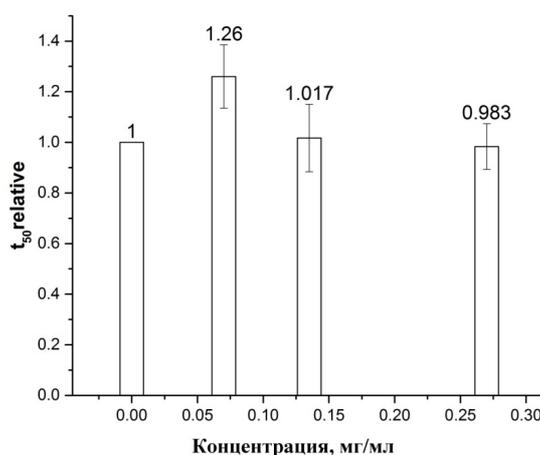


Рисунок 5. Зависимость эффективности мембранопротекторного действия галловой кислоты от ее концентрации

Сравнение эффективности мембранопротекторного действия антиоксидантов экстракта Бессмертника песчаного и экстракта антоциановой формы Кукурузы обыкновенной: Эффективность фотодинамического повреждения мембран оценивалась по скорости темнового гемолиза. Эффективность мембранопротекторного (антиоксидантного) действия экстрактов устанавливалась по величине  $t_{50\text{relative}}$  (отношение величин  $t_{50}$  для эритроцитов, инкубированных с экстрактом, к  $t_{50}$  для эритроцитов, инкубированных с физиологическим раствором), которая характеризовала скорость темнового фотоповреждения мембран эритроцитов. Чем выше величина этого отношения, тем сильнее способность антиоксидантов ингибировать сенсibilизированное фотоокисление, Рисунок 6.

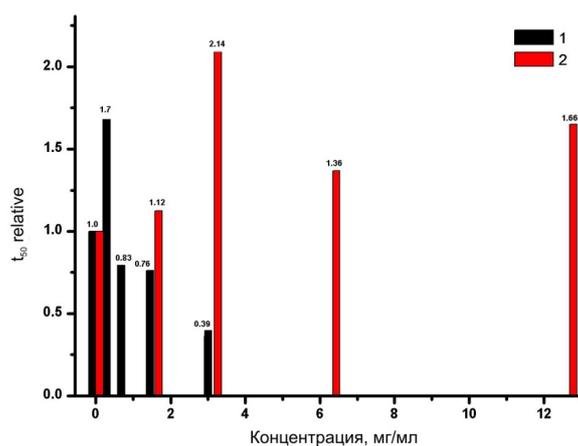


Рисунок 6. Сравнение эффективности мембранопротекторной (антиоксидантной) активности экстракта антоциановой формы Кукурузы обыкновенной (1) и экстракта Бессмертника песчаного (2) в интервале их низких концентраций

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что из двух тестируемых антиоксидантов наибольшую мембранопротекторную эффективность показывает экстракт Бессмертника песчаного, который дает максимальное значение величины  $t_{50\text{relative}}$  – 2.9 (при концентрации экстракта 12.7 мг/мл) по сравнению с контрольным образцом. Высокие концентрации обоих антиоксидантов снижают эффективность мембранопротекторного действия

(уменьшают ингибирование фотодинамического действия). Данный эффект может быть связан с уменьшением механической прочности мембран эритроцитов под воздействием компонентов экстрактов и/или фотоинициацией экстрактами ПОЛ при их высоких концентрациях, что согласуется с данными, полученными по мембранопротекторному действию Аврана лекарственного и его компонентов.

По основным результатам исследований делаются выводы, что:

1. Высокие концентрации растительных флавоноидосодержащих экстрактов Аврана лекарственного, Бессмертника песчаного и антоциановой формы Кукурузы обыкновенной снижают резистентность эритроцитов к фотодинамическому повреждению, что может быть связано с уменьшением механической прочности мембран или фотоинициацией экстрактами ПОЛ при их высоких концентрациях.

2. Мембранопротекторное действие Аврана лекарственного (увеличение ингибирования фотодинамического гемолиза) сильнее, чем у входящих в его состав отдельных компонентов Кверцетина и галловой кислоты, что может быть объяснено тем, что кроме названных, в экстракте могут присутствовать и другие компоненты, отвечающие за его антиокислительные свойства, которые могут по-разному взаимодействуют с мембранами клеток.

3. Экстракт антоциановой формы Кукурузы обыкновенной неэффективен при использовании данного экстракта в качестве антиоксиданта, тогда как экстракт Бессмертника песчаного демонстрирует высокие мембранопротекторные свойства в диапазоне его низких концентраций.

Глава 3 посвящена исследованию действия углеродных наноструктур фуллероидного типа Астраленов на эритроциты. В связи с гидрофобным характером Астраленов мы не смогли получить хорошо растворимые в физиологическом растворе суспензии даже при низких концентрациях наночастиц и при ультразвуковой обработке. Увеличить число «удерживаемых» в растворе гидрофобных Астраленов и получить удобный для работы препарат стало возможным после внесения в раствор водорастворимых аддуктов нанокластеров

углерода Астрален-С (ВААС). При приготовлении суспензии наночастиц для сенсбилизации эритроцитов к 50 мг сухого порошка Астраленов добавили 5 мл раствора ВААС с заданной фирмой-поставщиком концентрацией (Астралены и ВААС были получены от Пономарева А.Н., ООО «Научно-технический центр прикладных нанотехнологий»). Полученную суспензию дробили на ультразвуковой бане, после чего удалялись крупные всплывшие конгломераты, затем базовая суспензия гибридных наночастиц Астраленов разводилась физиологическим раствором до концентраций 0.00195, 0.03 мг/мл и добавлялась к 10% суспензии эритроцитов.

Для получения монослоя эритроцитов для исследования на атомно-силовом микроскопе отмытые от плазмы эритроциты белых беспородных лабораторных крыс вносились в пробирку с раствором Рингера (контрольный образец) или гибридными наночастицами. Чашка Петри с внесенным в нее бумажным фильтром, пропитанным раствором Рингера, насыщалась парами раствора, после чего в нее помещалось стекло с одной каплей 1% суспензии эритроцитов. В течение 30 минут клетки крови осаждались на стекло термостатированием при 37°C, после чего не осевшие на стекло эритроциты трижды смывались раствором Рингера, в результате получался разреженный монослой. Далее, в той же влажной камере на монослой эритроцитов наносилась капля фиксатора и выдерживалась при комнатной температуре в течение 30 минут. После этого образец трижды отмывался дистиллированной водой для того, чтобы смыть излишки фиксатора и соли из раствора Рингера, после чего образец подсушивался при комнатных условиях.

Исследование механизма фотоповреждения мембран эритроцитов, вызванных Астраленами: В первой серии экспериментов изучалась зависимость скорости фотоиндуцированного гемолиза эритроцитов от мощности лазерного облучения, образцы облучались в течение 15 минут, Рисунок 7.

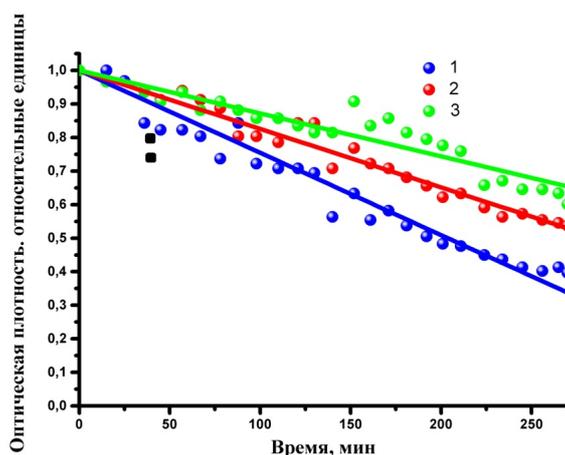


Рисунок 7. Динамика задержанного при одинаковом времени облучения образцов (15 минут) в условиях разной плотности мощности: 1 – 120 Дж/см<sup>2</sup>, 2 – 35 Дж/см<sup>2</sup>, 3 – 10 Дж/см<sup>2</sup>

Полученные зависимости показывают естественное уменьшение скорости гемолиза (наклон аппроксимирующей кривой) при уменьшении дозы облучения. Для анализа дозовой зависимости скорости гемолиза при постоянной концентрации введенного сенсibilизатора использовалось эмпирическое уравнение (1):

$$1/t_{50} = g * L^k * C_t^j \quad (1)$$

где  $t_{50}$  – время темновой стадии, необходимое для гемолизации 50% эритроцитов;  $C_t$  – суммарная концентрация красителя;  $L$  – доза падающего света;  $j$  и  $k$  – феноменологические показатели степени. Для определения константы  $k$  из экспериментальных данных, Уравнение (1) было линеаризовано и приведено к виду:

$$\ln t_{25} = -\ln g - k \ln L \quad (2)$$

Линейная аппроксимация дает значение  $k = 4.02 \pm 0.01$ . Полученное значение  $k$  велико по сравнению с опубликованными данными по некоторым фотодинамическим красителям (мембраносвязывающие красители дают величину порядка 2, которая при высоких дозах уменьшается до 1.5).

Фотогемолиз, протекающий при фотодинамической сенсibilизации красителем, является кислородным процессом, т.е. фотобиологический эффект

(гемолиз) происходит при облучении сенсibilизированного объекта в присутствии кислорода. Чтобы подтвердить кислородный характер сенсibilизированного наночастицами Астраленами фотогемолиза, были проведены эксперименты по деоксигенации сенсibilизированной суспензии эритроцитов. Деоксигенация проводилась химическим методом путем добавления в суспензию тиосульфата натрия ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). На Рисунке 8 представлена динамика задержанного гемолиза, полученная в этих экспериментах. Из графика видно, что уменьшение количества кислорода в системе приводит к двойному снижению скорости задержанного гемолиза. Это свидетельствует о том, что фотоцитотоксическое (гемолитическое) действие гидрофобных Астраленов в водном растворе носит кислородный характер.

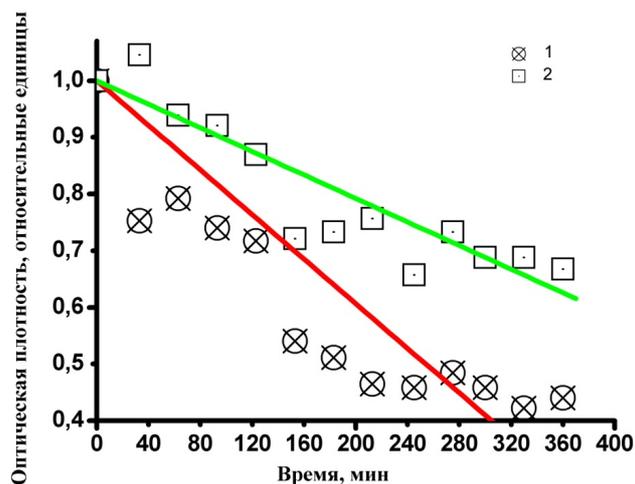


Рисунок 8. Динамика задержанного фотогемолиза образцов: 1 - контроль, 2 - деоксигенированного тиосульфатом натрия

Исследование темнового взаимодействия Астраленов с эритроцитами методом цифровой голографической микроскопии: В ходе предыдущих исследований возникло предположение об образовании в ходе длительного выдерживания эритроцитов в суспензии наночастиц агрегатов, образованных несколькими эритроцитами, декорированными наночастицами. Однако прямых микроскопических наблюдений за изменением формы и размеров эритроцитов и образованием агрегатов при экспозиции в суспензии углеродных наночастиц проведено не было, хотя именно эти процессы могут быть ответственными за

темновую динамику оптической плотности смешанных суспензий. В течение 2,5 часов после приготовления смешанной суспензии велся контроль состояния эритроцитов с помощью цифрового голографического фазового микроскопа. На Рисунке 9 приведены голографические изображения эритроцитов крысы, полученные через различные интервалы времени (указаны в секундах) после смешивания суспензий эритроцитов и наночастиц.

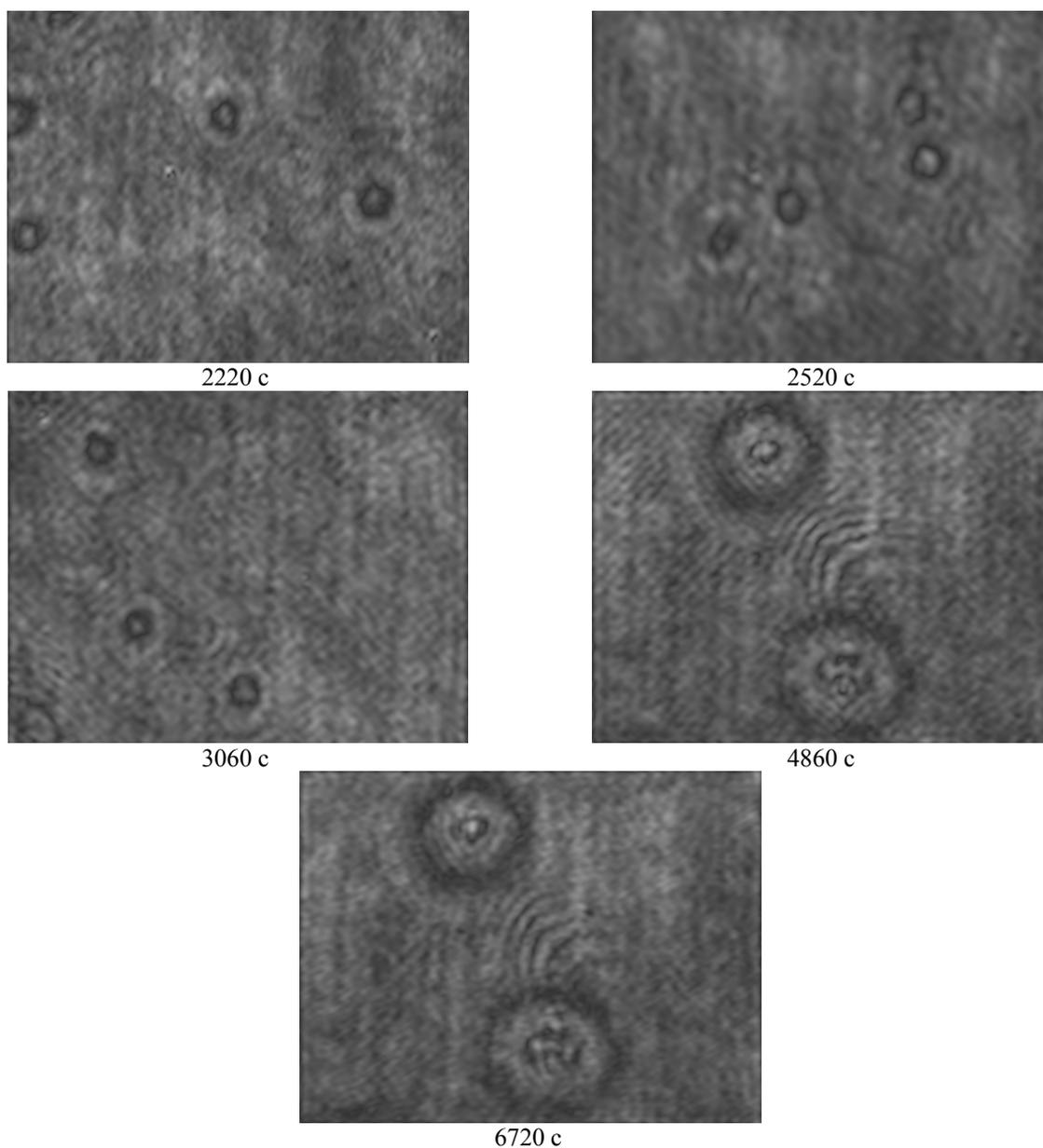


Рисунок 9. Голографические изображения эритроцитов крысы, полученные через различные интервалы времени (указаны в секундах) после смешивания суспензий эритроцитов и наночастиц.

Начиная с 2000 секунды наблюдения до 4000 секунды, наблюдается сосредоточение адсорбированных мембраной углеродных наночастиц в области вогнутости эритроцитарного диска, при этом контуры внешней окружности эритроцитарной мембраны не окрашены и очень слабо различимы на голографической фотографии. На указанном временном интервале происходит медленное увеличение размеров эритроцитов без значимого перераспределения плотности адсорбированных наночастиц. Такое увеличение размеров эритроцита, сопровождающееся, по всей видимости, и процессом сферуляции, ведет к увеличению сечения рассеяния эритроцитов и увеличению оптической плотности образца. Начиная со времени наблюдения порядка 3500 с происходит постепенное потемнение внешних контуров мембраны эритроцитов с одновременным уменьшением плотности участка вогнутости мембраны. Можно предполагать, что потемнение периферических областей связано, как с перераспределением адсорбированных наночастиц, так и с дополнительной адсорбцией углеродных частиц при растяжении мембраны и изменении ее локальных адгезионных свойств, которые, при дальнейшем протекании процесса, могут приводить к лизису мембран эритроцитов с высвобождением клеточного содержимого и образованием пустых мембранных оболочек, имеющих меньшее сечение рассеяния. Такие клеточные оболочки «тени» эритроцитов видны на световых микрофотографиях, приведенных на Рисунке 10.

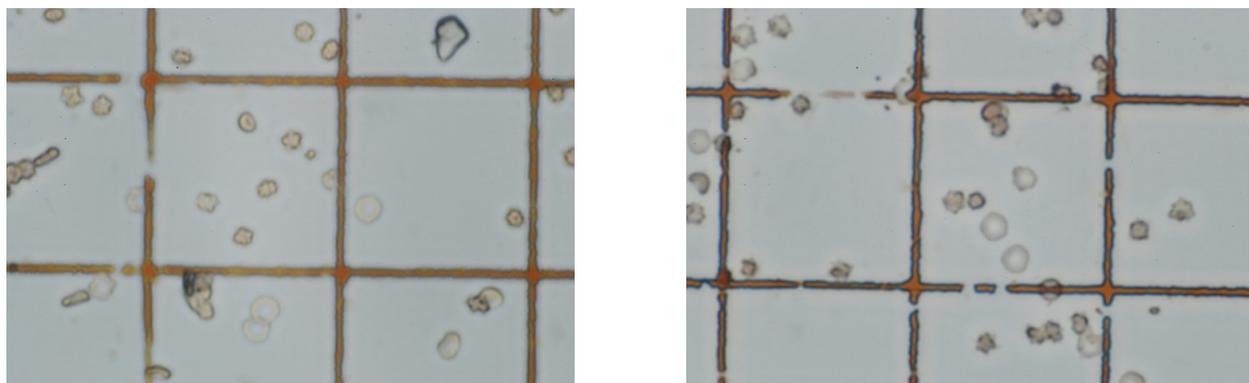


Рисунок 10. Тени эритроцитов, наблюдаемые на световых микрофотографиях при времени инкубации сложных суспензий более 10000 с.

Второй причиной, приводящей к снижению оптической плотности смешенной суспензии при длительной инкубации, может являться образование

агрегатов эритроцитов, стимулированное изменением свойств мембран под действием адсорбированных углеродных наночастиц; образование агрегатов окрашенных клеток приводит усилению проявления эффекта сита. На Рисунке 11 приведены микрофотографии суспензии при времени инкубации, превышающем 14000 с.

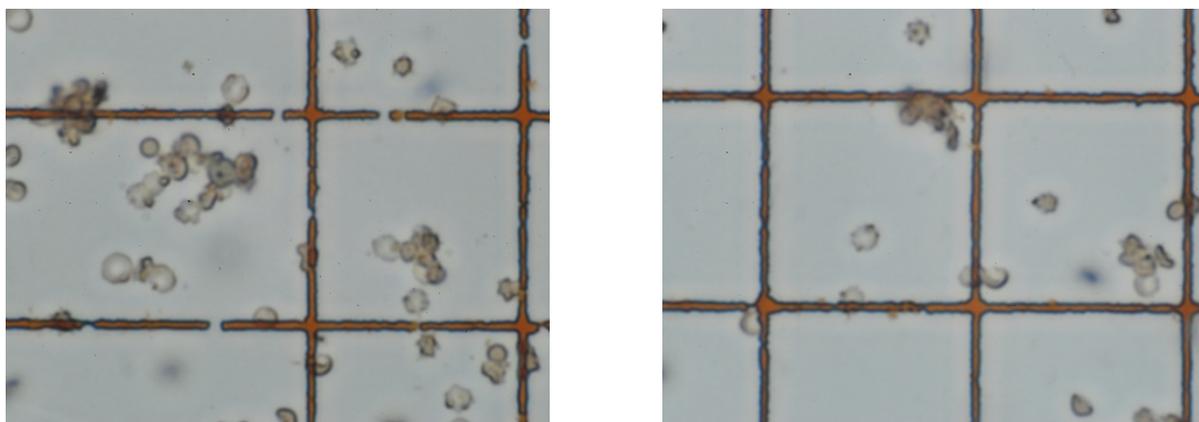


Рисунок 11. Агрегаты эритроцитов, наблюдаемые на световых микрофотографиях при времени инкубации сложных суспензий более 14000 с.

Исследование темнового взаимодействия Астраленов с эритроцитами методом атомно-силовой микроскопии: Для проведения экспериментов на 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*.

В ходе проведения экспериментальной работы были получены 3-х мерные АСМ-изображения, по которым можно детально оценить структуру поверхности мембраны клетки. По результатам экспериментов были получены изображения в контактном режиме сканирования «чистых» эритроцитов (Рисунок 12) и эритроцитов, декорированных гибридными наночастицами Астраленами (Рисунки 13).

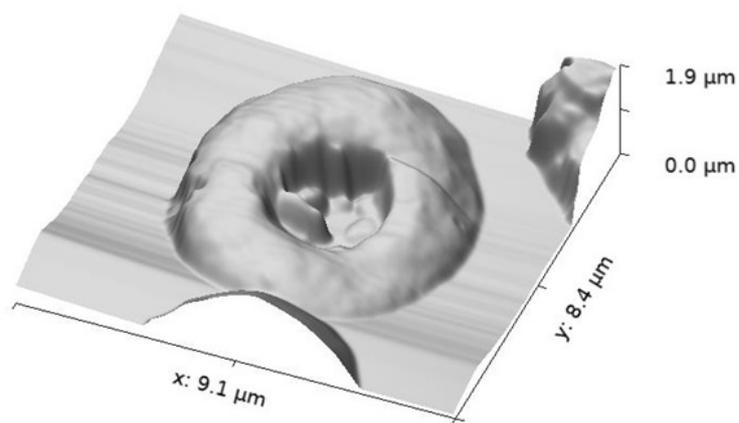


Рисунок 12. АСМ-изображение эритроцита без декорирования гибридными наночастицами Астраленами (контрольный образец)

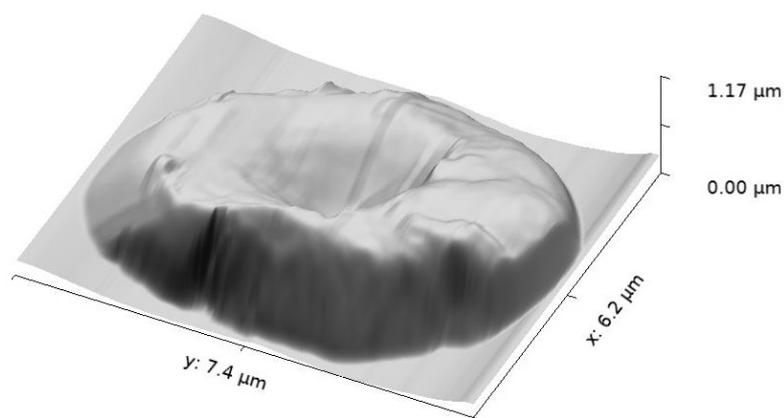


Рисунок 13. АСМ-изображение эритроцита, декорированного гибридными наночастицами Астраленами

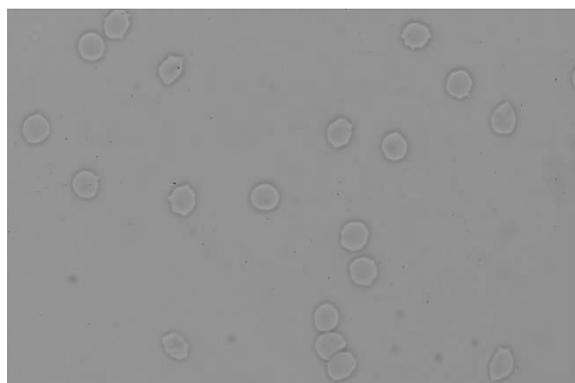
На 3D-изображении эритроцита с адсорбированными гибридными наночастицами Астраленами видны выступы, что свидетельствует о формировании эхиноцитов, предположительно, за счет того, что наночастицы встраиваются в наружный слой мембраны, что может приводить к ее структурным изменениям за счет перераспределения липидов.

По рисункам 12-13 видно, что на поверхности мембран контрольных («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

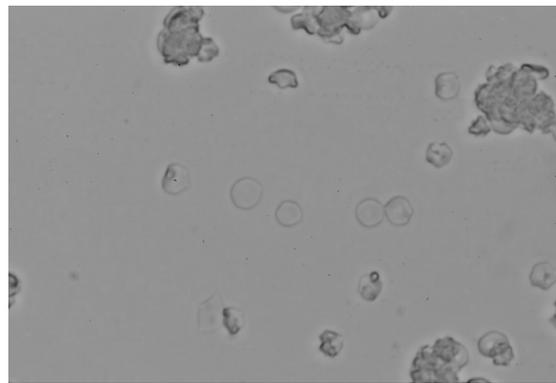
перемещении в центральном потоке крови внутри сосудов. Однако, при адсорбции наночастиц на поверхность мембраны центральное углубление имеет более сглаженный вид, чем у «чистых» эритроцитов, что может препятствовать естественной агрегации клеток.

Исследование взаимодействия комплекса протопорфирин IX – Астралены с эритроцитами методом оптической микроскопии: При анализе фотогемолитической активности гибридных наночастиц Астраленов возникла задача повышения фотодинамической эффективности гибридных наноструктур путем нанесения на суспензии углеродные наночастицы красителя-сенситизатора, дающий высокий выход синглетного кислорода – протопорфирин IX (ПП 9), стандартный сенситизатор 2-го поколения. С помощью оптической микроскопии рассматривается изменение морфологии клеток (эритроцитов) с нанесенным на них комплексом протопорфирин IX – гибридные наночастицы Астралены в сравнении с «чистыми» эритроцитами, эритроцитами в растворе протопорфирина IX и в суспензии гибридных наночастиц Астраленов. Микрофоторегистрация образцов суспензий эритроцитов осуществлялась в течение 3 часов, на микрофотографиях не наблюдались тени эритроцитов, что свидетельствует об отсутствии спонтанного лизиса клеток, и, соответственно, об отсутствии темновой токсичности всех агентов.

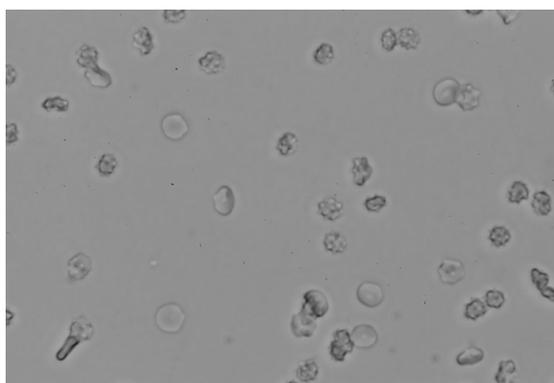
На Рисунке 14 представлены микрофотографии после 1 часа инкубации. Отмечается образование большого числа агрегатов в образце с внесенным протопорфирином IX, чего не наблюдалось в образцах с углеродными наночастицами.



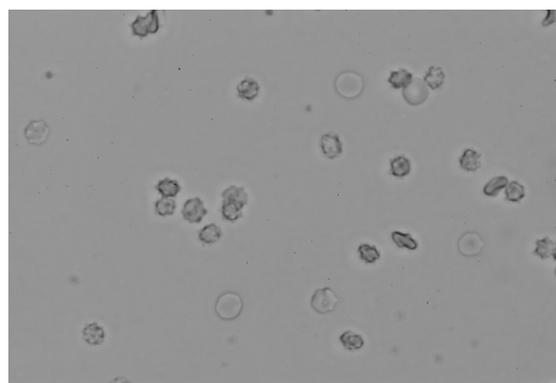
a)



b)



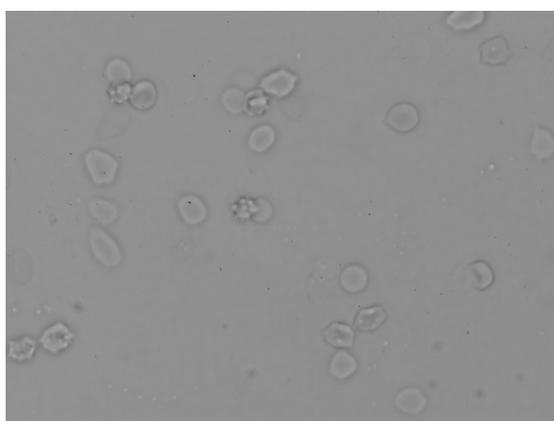
c)



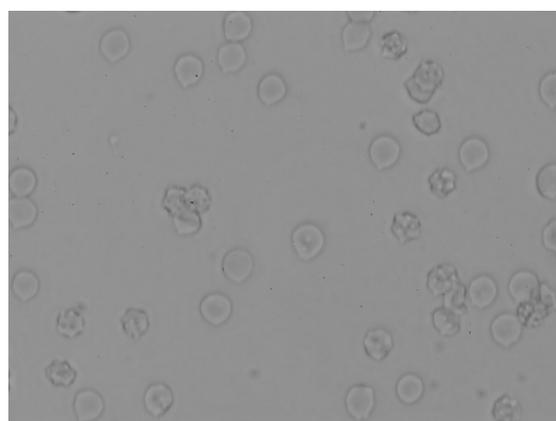
d)

Рисунок 14. Микрофотографии первого часа наблюдения эритроцитов в: а) NaCl, б) ПП 9, с) Астралены, д) Комплексе ПП 9 – Астралены

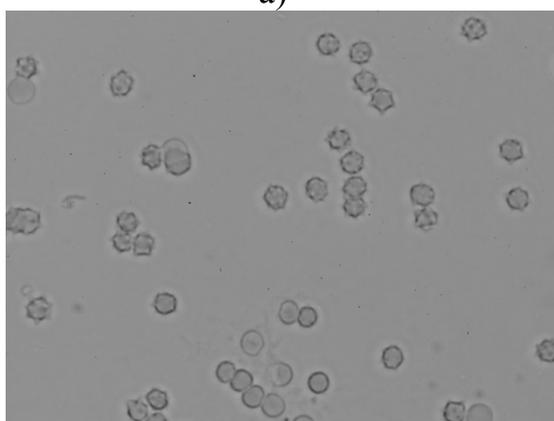
После 1-го часа наблюдений происходит разъединение агрегатов эритроцитов с ПП 9, через 3 часа агрегатов не наблюдается вовсе, Рисунок 15.



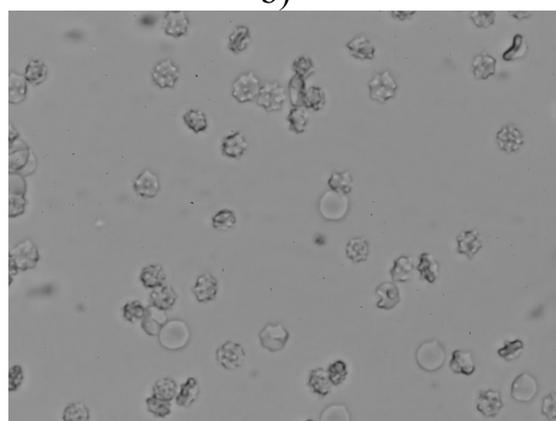
a)



b)



c)



d)

Рисунок 15. Микрофотографии третьего часа наблюдения эритроцитов в: а) NaCl, б) ПП 9, с) Астралены, д) Комплексе ПП 9 – Астралены

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 и сульфогрупп ВАУН. Очевидно, что следствием усиления отрицательного заряда мембраны является преобладание Кулоновских сил при взаимодействии декорированных наночастицами эритроцитов, так как связанные с поверхностью одного эритроцита наночастицы из-за отталкивания одноименных зарядов не могут связаться с поверхностью другого, рядом находящегося.

По микрофотографиям были рассчитаны оптическая плотность и размер эритроцитов, а также вычислена доля эхиноцитов в общем количестве эритроцитов. Данные представлены на Рисунках 16-18 (1) NaCl, 2) ПП 9, 3) Астралены, 4) Комплексе ПП 9 – Астралены).

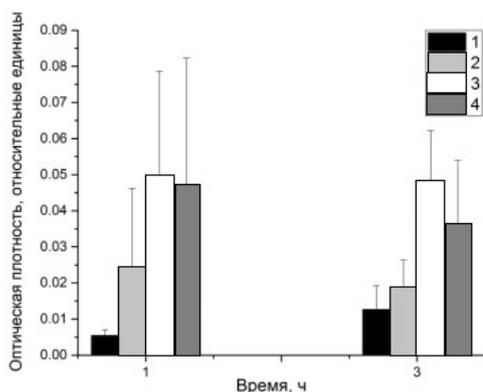


Рисунок 16. Оптическая плотность

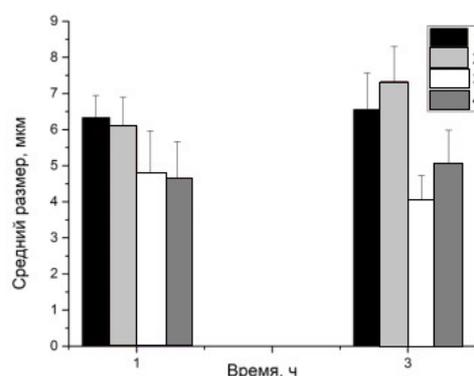


Рисунок 17. Размеры эритроцитов

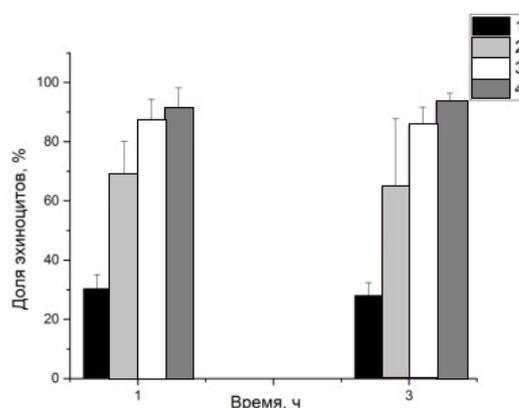


Рисунок 18. Доля эхиноцитов среди эритроцитов

Из представленных на Рисунке 16 данных видна значительная разница оптической плотности ПП 9 и образцов с Астраленами. Это объясняется тем, что

для связывания ПП 9 с мембранными липидами требуется значительно больше времени, чем в случае образцов с Астраленами. Кроме того, видна разница в оптической плотности между образцами с Астраленами и образцами с комплексом, что может являться проявлением взаимодействия наночастиц с примембранным цитоскелетом. Во-вторых, отмечается уменьшение размеров эритроцитов с адсорбированными Астраленами 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. 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, что согласуется с данными, полученными методом атомно-силовой микроскопии.

В ходе проведения экспериментов по исследованию действия углеродных наноструктур фуллероидного типа Астраленов на мембраны эритроцитов были получены следующие результаты, имеющие практическую значимость при использовании исследуемых наночастиц в медицинском применении:

1. Сенсibilизированной гибридными наночастицами Астраленами фотогемолиз эритроцитов происходит по коллоидно-осмотическому механизму.

2. В ходе экспериментов по сенсibilизированному наночастицами Астраленами фотодинамическому гемолизу был рассчитан феноменологический показатель степени  $k = 4.02 \pm 0.01$ . Достаточно большое значение этого показателя может свидетельствовать об изменении кинетического порядка фотохимической реакции из-за сенсibilизации гибридными наночастицами Астраленами.

3. Разработан и апробирован метод приготовления монослоя эритроцитов, который позволяет изучать образцы, полученные не из мазка клеток, а из суспендированного раствора. При данной методике приготовления образцов достаточно долгое время исследуемые клетки остаются не разрушенными и не меняющими свою исходную морфологию.

4. Взаимодействие гибридных наночастиц Астраленов с мембранами эритроцитов приводит к формированию на ее поверхности выступов, что свидетельствует об изменении формы эритроцитов на эхиноцитарную, предположительно, за счет того, что наночастицы встраиваются в наружный слой мембраны, что может приводить к ее структурным изменениям за счет перераспределения липидов.

5. Процесс связывания комплекса протопорфирин IX – гибридные наночастицы Астралены с мембраной эритроцитов полностью проходит в течение первого часа инкубации, что в случае клинического применения Астраленов и комплекса с ними позволяет проводить фотодинамическую терапию намного быстрее.

6. У эритроцитов с нанесенным комплексом протопорфирин IX – гибридные наночастицы Астралены не наблюдалась сильная агрегация, однако, количество эхиноцитов больше, чем в контрольном образце и у эритроцитов с нанесенным протопорфирином IX.

7. Взаимодействие гибридных наночастиц Астраленов с мембранами эритроцитов ведет к увеличению лабильности эритроцитов, что, предположительно, объясняется уменьшением адгезии эритроцитов к стеклу.

### **Заключение**

Основные выводы по данной работе заключаются в следующем:

1. Высокие концентрации растительных флавоноидосодержащих экстрактов Аврана лекарственного, Бессмертника песчаного и антоциановой формы Кукурузы обыкновенной снижают резистентность эритроцитов к фотодинамическому повреждению.

2. Мембранопротекторное действие Аврана лекарственного сильнее, чем у входящих в его состав отдельных компонентов Кверцетина и галловой кислоты.

3. Экстракт антоциановой формы Кукурузы обыкновенной неэффективен при использовании данного экстракта в качестве антиоксиданта, тогда как экстракт Бессмертника песчаного демонстрирует высокие мембранопротекторные свойства в диапазоне его низких концентраций.

4. Сенсibilизированный гибридными наночастицами Астраленами гемолиз идет по коллоидно-осмотическому механизму.

5. Взаимодействие гибридных наночастиц Астраленов с мембранами эритроцитов приводит к формированию эхиноцитов.

6. Связывания комплекса протопорфирин IX – гибридные наночастицы Астралены с мембраной эритроцитов полностью проходит в течение первого часа инкубации, что в случае клинического применения Астраленов и комплекса с ними позволяет проводить фотодинамическую терапию намного быстрее

#### **Основные публикации по теме диссертации**

- Tkachenko N.V., Navolokin N.A., Polukonova N.V., Pravdin A.B., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Terentyuk G.S. The morphological and functional changes in cytoplasmic membranes of rat erythrocytes and SPEV-2 cells under the influence of *Gratiola officinalis* extract. International Workshop Structure and Functions of Biomembranes. 29.09.2014-03.10.2014: Book of Abstracts. Dolgoprudny: M1PT, 2014, p. 86-87
- Natalie Tkachenko, Alexander Pravdin, George Terentyuk, Nikita Navolokin, Maria Kurchatova, Natalia Polukonova. Inhibition of photodynamic haemolysis by *Gratiola officinalis* L. extract. Proc. of SPIE, 2014, V. 9448, p. 94480P-1 – 8.
- Н.В. Ткаченко, Е.В. Нарзыева, А.А. Серов, А.Б. Правдин. Влияние растительного антиоксиданта на стойкость мембран эритроцитов по отношению к фотодинамическому воздействию. Взаимодействие сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и

- биообъектами: материалы Всерос. научной школы-семинара /под ред. проф. Д. А. Усанова. – Саратов: изд-во Саратовский источник, 2015, стр. 101 -103
- Ткаченко Н.В., Правдин А.Б., Е.В. Быкова, Н.А. Наволокин, Н.В. Полуконова, А.Б. Бучарская. Сравнение мембранопротекторной эффективности флавоноидосодержащих растительных антиоксидантов при фотодинамическом гемолизе. Проблемы оптической физики и биофотоники. SFM-2015/ под ред. Г. В. Симоненко, В. В. Тучина. – Саратов: изд - во «Новый ветер», 2015. С. 7-10.
  - Tkachenko N.V., Bykova E.V., Pravdin A.B., Navolokin N.A., Polukonova N.V., Bucharskaya A.B., Mudrak D.A. , Prilepskii A.Y. Comparison of membrane-protective activity of antioxidants quercetine and *Gratiola Officinalis L.* extract under the conditions of photodynamic haemolysis. Proc. of SPIE, 2016, Vol. 9917, p. 99170L-1 – 6.
  - Ткаченко Н.В., Доронкина А.А., Намыкин А.А., Правдин А.Б. Влияние комплекса протопорфирин IX – углеродные наночастицы фуллероидного типа на морфологию эритроцитов. Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2016: материалы Всерос. школы-семинара/под ред. проф. Д.А. Усанова – Саратов: изд-во Саратовский источник, 2016, с. 18-20
  - Д.М. Клычкова, Н.В. Ткаченко. Оценка влияния галловой кислоты на механическую прочность эритроцитарных мембран. Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2016: материалы Всерос. школы-семинара/под ред. проф. Д.А. Усанова – Саратов: изд-во Саратовский источник, 2016, с. 46-48
  - Ткаченко Н.В., Доронкина А.А., Правдин А.Б., Кочубей В.И., Тучин В.В. Визуализация эритроцитов с адсорбированными углеродными наночастицами методом атомно-силовой микроскопии. Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2017: материалы Всерос. школы-семинара/под ред. проф. Д.А. Усанова – Саратов: изд-во Саратовский источник, 2017, с. 92-94
  - Ткаченко Н.В., Доронкина А.А., Наволокин Н.А., Правдин А.Б., Кочубей В.И., Тучин В.В. Атомно-силовая микроскопия при анализе изменения цитоскелета мембран эритроцитов под действием углеродных наночастиц. Взаимодействие

сверхвысокочастотного, терагерцового и оптического излучения с полупроводниковыми микро- и наноструктурами, метаматериалами и биообъектами: материалы Всерос. научной школы-семинара /под ред. проф. Д. А. Усанова. – Саратов: изд-во Саратовский источник, 2018, стр. 77 -79

- Ткаченко Н.В., Правдин А.Б., Львов Н.И., Бриль Г.Е. Сравнение фотодинамического действия на мембраны эритроцитов фотосенсибилизаторов димегин и фотодитазин. *Bulletin of Medical internet conferences*, 2015, V. 5, I. 11, p. 1366.
- Ткаченко Н.В., Правдин А.Б., Львов Н.И., Бриль Г.Е. Оценка фотомембранотоксичности сенсбилизаторов димегина и фотодитазина. XIII Всероссийский молодежный Самарский конкурс-конференция научных работ по оптике и лазерной физике: сборник конкурсных докладов, 2015, стр. 414-420.