

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физиологии человека и животных

**ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ МЕДНЫХ
НАНОЧАСТИЦ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы
Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология
биологического факультета
Кауновой Дарьи Дмитриевны

Научный руководитель:
зав. кафедры физиологии
человека и животных, д.б.н.  О. В. Семякина-Глушковская

Научный консультант:
ст.н.с. ОНИ НС и БС, к. ф – м. н.  М.В. Ломова

Зав. кафедрой физиологии
человека и животных, д.б.н.  О. В. Семякина-Глушковская

Саратов 2019

Актуальность работы. Исследование наночастиц металлов на сегодняшний день является одним из перспективных научных направлений. Изучение физических свойств наноматериалов является одной из наиболее динамично развивающихся областей исследования. Такая заинтересованность связана с тем, что при переходе от макроструктур к наноструктурам равновесные и динамические свойства материалов сильно различаются от свойств тех же материалов в макроскопическом состоянии и свойств изолированных атомов или молекул данного вещества. Характеристика наночастиц зачастую зависит от формы, размера, поверхностных свойств и др.

В настоящее время наночастицы нашли широкое применение во многих областях человеческой деятельности благодаря своим уникальным физическим и химическим свойствам, таким как небольшой размер, высокая удельная площадь поверхности, высокая реактивность и т. д.

Особое внимание уделяется исследованию действия на организм нанопорошков биогенных металлов, в частности меди, цинка, железа, биологическая ценность которых определяется многогранностью функций в сложных биохимических процессах и активным участием в клеточном метаболизме, обеспечивающем нормальное функционирование организма.

Наночастицы меди активно применяют в медицинских препаратах, косметической продукции, лаках, красках, фильтрах для воды, упаковке, медицинских изделиях, белье. Благодаря ионам меди, эти частицы обладают бактерицидными свойствами, они убивают большинство вредных микроорганизмов, не вызывая резистентности у бактерий, в отличие от антибиотиков. Однако их безопасность для организма остается под вопросом. Ученые располагают данными о том, что наночастицы меди могут быть токсичны для разных органов тела – мозга, печени, легких. Несмотря на то, что антибактериальные свойства меди были известны в течение длительного времени, а наночастицы успешно использовались в качестве антибактериальных агентов, механизм их воздействия до конца не изучен.

Наночастицы обладают более высокой токсичностью по сравнению с

обычными микрочастицами, способны проникать в неизменном виде через клеточные барьеры, циркулировать и накапливаться в органах и тканях, вызывая более выраженные патоморфологические поражения внутренних органов. Токсичность наночастиц определяется их формой и размерами, при этом мельчайшие наночастицы веретенообразной формы вызывают более разрушительные эффекты в организме, нежели подобные им частицы сферической формы. В связи с этим, исследование цитотоксичности наночастиц является актуальной темой и представляет несомненный научный и практический интерес.

В ряде публикаций описывается, что наночастицы меди способны повреждать клеточную стенку и клеточную мембрану бактерий, тем самым приводя к ее гибели. Более того, многие наноструктуры могут агрегироваться в процессе их производства и использования. Это происходит из-за низкого поверхностного заряда, который обычно предотвращает образование частиц. Одной из проблем при создании и использовании таких материалов является стабилизация формы и размера наночастиц. Применение стабилизирующих агентов, наиболее перспективными в настоящее время являются полимеры, позволяет успешно решить данную проблему. Возрастающие потребности в продукции химической, фармацевтической, косметической, пищевой и другой промышленности требуют создания новых путей получения биологически активных соединений. Стабилизаторы позволяют реализовать уникальные свойства наночастиц металлов.

В связи с этим были проведены исследования, в ходе которых выявлены наночастицы стабилизированные различными полимерами, которые можно будет рекомендовать для дальнейшего безопасного производства материалов, обладающих антисептическим действием.

Цель данной работы состояла в оценке и описании некоторых физических свойства, а также цитотоксичность стабилизированных наночастиц меди и их стабилизаторов.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Охарактеризовать морфологию наночастиц меди методом сканирующей электронной микроскопии (SEM);
2. Определить диапазон флюоресцирования наночастиц меди для подбора красителя фибробластов;
3. Оценить цитотоксический эффект стабилизаторов на дермальные фибробласты человека;
4. Оценить цитотоксический эффект стабилизированных наночастиц меди на дермальные фибробласты человека.

Структура бакалаврской работы. Выпускная квалификационная работа состоит из пяти частей: введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть включает в себя три раздела: обзор литературы, материал и методы и результаты исследования. Раздел обзор литературы состоит из семи подразделов: наночастицы меди, характеристика и свойства; методы получения наночастиц; методы изучения наночастиц; оценка токсичности наночастиц; механизмы токсического воздействия наночастиц меди на клетки и живые организмы; влияние физических свойств наночастиц на их токсичность; области применения наночастиц. Раздел материалы и методы представлен описанием исследуемых объектов и условий проведения эксперимента. Раздел результаты исследования включает в себя четыре подраздела: электронная микроскопия и размеры наночастиц; спектр флуоресценции стабилизаторов и стабилизированных наночастиц меди; цитотоксичность стабилизаторов; цитотоксичность стабилизированных наночастиц.

Объектом исследования выступали дермальные фибробласты человека (HDF). В ходе исследования были использованы наночастицы меди, полученные методом химического восстановления и предоставленные ООО “М9”. В качестве стабилизаторов наночастиц меди использовались следующие полимерные соединения: 0,7% поливиниловый спирт (PVA), 0,15%

додецилсульфат натрия (SDS), 0,15% олеат натрия (Ole Na), 0,01% карбоксиметилцеллюлоза (СМС), 2% агароза (AgA).

Основное содержание работы. Работа выполнена на базе отдела клеточной инженерии ОНИ НС и БС Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского.

Постановка эксперимента. Морфологические характеристики наночастиц меди определяли методом сканирующей электронной микроскопий (СЭМ). Изображения СЭМ были получены с использованием электронного микроскопа MIRA II LMU (Tescan) при рабочем напряжении 30 кВ. В процессе измерения увеличение составляло от 100 до 40000 раз.

С помощью микропланшетного спектрофотометра Synergy H1 (BioTek, США) были получены спектры флуоресценции стабилизированных наночастиц меди. Интенсивность флуоресценции оценивалась при длине волны 590 нм. Длина волны возбуждения варьировала в диапазоне от 250 до 560 нм с шагом в 2 нм.

Культуру клеток выращивали на культуральной посуде с адгезивным покрытием на питательной среде MEM, содержащей 10% FBS и 1% пенициллин-стрептомицинового антибиотика. Среду заменяли каждые 3 дня. Культуру клеток выращивали в инкубаторе при 37°C в газовой среде, содержащей 5% CO₂. После образования монослоя клеточную культуру снимали с культуральной посуды с использованием 0,05% трипсина с добавлением ЭДТА и подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток Countess™ (Thermo Fisher Scientific, США).

Цитотоксичность наночастиц меди стабилизированных полимерными соединениями оценивали на культуре клеток HDF. Клетки высевали в 96-луночный иммунологический планшет в количестве 10⁴ клеток на лунку. После 24 часов инкубирования к культуре клеток добавляли стабилизированные наночастицы меди и инкубировали в течение суток. После этого в каждую лунку добавляли 10 мкл флуоресцентного красителя AlamarBlue (Sigma-Aldrich,

США). Далее интенсивность флуоресценции красителя (560/590 нм) измеряли с помощью спектрофотометра Synergy H1. В качестве контроля выступали клетки без добавления наночастиц, стабилизаторов и их комплексов. Состояние клеток оценивали с помощью инвертированного микроскопа с флуоресцентным модулем Olympus IX73 (Olympus, Япония), предназначенным для работы с биологическими объектами с возможностью визуализации живых клеток. Каждый эксперимент проводили в десятикратной повторности.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали программу Microsoft Excel 2010 с учетом t – критерия Стьюдента для $p \leq 0,05$.

Обсуждение результатов исследования. Цитотоксический эффект наночастиц меди зависит от удельной поверхности и от их размера. В связи с этим были оценены размеры наночастиц меди с помощью световой электронной микроскопии (СЭМ) и распределение их по размеру с помощью анализа изображений.

Наночастицы меди имели сферическую форму и диаметр от 16,2 до 35,8 нм, максимальное число частиц имело размер от 26 до 28,3 нм.

Спектры флуоресценции стабилизаторов и стабилизированных наночастиц измеряли в диапазоне от 250 до 550 нм с возбуждением при 350 нанометрах. Было обнаружено, что спектры флуоресценции 2% AgA, а также наночастиц меди, стабилизированные 2% AgA, соответствуют пику эмиссии при 450 нм. Другие стабилизаторы не имели специфических пиков эмиссии.

Данные полученных спектров флуоресценции стабилизаторов и стабилизированных наночастиц меди позволяют использовать AlamarBlue в качестве красителя для оценки цитотоксичности стабилизированных наночастиц, который функционирует как индикатор состояния клеток.

Проводилось исследование по оценке цитотоксического эффекта стабилизаторов на клетки человеческих фибробластов. Контроль составлял 100%. Делалось разведение при 10%, 20% и 30% объеме среды.

При десятипроцентном объеме от среды наблюдался следующий цитотоксический эффект стабилизаторов на клетки фибробластов человека –

количество клеток при анализе действия поливинилового спирта (PVA) в концентрации 0,7% показал 99,78%, при воздействии детергента карбоксиметилцеллюлозы (СМС) в концентрации 0,01% выживаемость фибробластов составила 99,85%, анализ цитотоксичности додецилсульфата натрия (SDS) в концентрации 0,15% показал низкий процент выживаемости клеток равный 6,37%, олеата натрия (Ole Na) в концентрации 0,15% показал выживаемость клеток равную 75,61%, а 2% раствор агарозы (AgA) 94,85% выживших клеток.

При увеличении объема до 20% наблюдался следующий цитотоксический эффект стабилизаторов на клетки фибробластов человека – действия поливинилового спирта (PVA) в концентрации 0,7% уменьшало количество выживших клеток до 98,6%, воздействие карбоксиметилцеллюлозы (СМС) в концентрации 0,01% незначительно снижало выживаемость клеток до 99,13%, повышение додецилсульфат натрия (SDS) в концентрации 0,15% до 20% приводило к усилению цитотоксического эффекта до 6,32% клеток, анализ цитотоксичности олеата натрия (Ole Na) в концентрации 0,15% показал усиление цитотоксического эффекта до 8,53% выживших клеток, использование агарозы (AgA) в концентрации 2% показал выживаемость клеток равную 92,6%.

Увеличение объема до 30% показало следующий цитотоксический эффект стабилизаторов на клетки фибробластов человека – оценка цитотоксичности поливинилового спирта (PVA) в концентрации 0,7% дало 96,28 процентную выживаемость клеток фибробластов, выживаемость клеток при воздействии карбоксиметилцеллюлозы (СМС) в концентрации 0,01% составляла 94,63%, использование додецилсульфат натрия (SDS) в концентрации 0,15% показало 5,95% выживших клеток, оценка цитотоксичности олеата натрия (Ole Na) в концентрации 0,15% показала выживаемость клеток равную 8,1%, использование агарозы (AgA) в концентрации 2% показало цитотоксический эффект равный 83,62% выживших клеток.

Исследование цитотоксичности стабилизированных наночастиц меди показало следующие результаты. Контроль (клетки без добавления наночастиц) составлял 100%.

Добавление двухсот нанограмм на лунку наночастиц меди стабилизированных PVA в концентрации 0,7% не оказывало цитотоксического эффекта на клетки фибробластов. Комплекс меди и СМС в концентрации 0,01% оказывал незначительный цитотоксический эффект и выживаемость клеток была равно 99,5%. Наночастицы меди стабилизированные SDS в концентрации 0,15% оказывали слабый токсический эффект и выживаемость клеток была равна 98,1%. Комплекс наночастиц меди стабилизированных Ole Na в концентрации 0,15% показывал выживаемость клеток равную 98,8%. Добавление наночастиц меди стабилизированных 2% AgA не вызывало токсического эффекта.

Увеличение массы стабилизированных наночастиц меди до 300 нанограмм показывало выживаемость клеток при добавлении 0,7% PVA равную 93,8%. Добавление Комплекс меди и 0,01% СМС увеличивало токсический эффект на клетки и выживаемость была 92,9%. При добавлении наночастиц стабилизированных SDS в концентрации 0,15% цитотоксический эффект возрастал и выживаемость клеток была равна 58,8%. Комплекс наночастиц меди стабилизированных Ole Na в концентрации 0,15% показывал выживаемость клеток равную 93,1%. Добавление наночастиц меди стабилизированных 2% AgA показало выживаемость клеток равную 92,9%.

Добавление 400 нанограмм стабилизированных наночастиц меди на лунку показало следующий результат. Наночастицы меди стабилизированные PVA в концентрации 0,7% усиливало цитотоксический эффект и выживаемость клеток была равно 82,4%. Комплекс наночастиц меди и СМС в концентрации 0,01% снижал выживаемость клеток до 77,5%. Наночастицы меди стабилизированные SDS в концентрации 0,15% оказывали сильный токсический эффект и выживаемость клеток была равно всего 11,5%. Добавление наночастиц меди стабилизированных Ole Na в концентрации 0,15%

показало результат равный 22%. При добавлении комплекса наночастиц меди и 2% AgA выживаемость клеток была равна 82,8%.

Заключение. По результатам проведенной работы были сделаны следующие выводы:

1. С помощью сканирующей электронной микроскопии (SEM) установили, что использованные в работе наночастицы имели сферическую форму и диаметр от 16,2 до 35,8 нм, максимальное число частиц имело размер от 26 до 28,3 нм.
2. Установили, что спектры флуоресценции 2% раствора агарозы, а также наночастиц меди, стабилизированных агарозой, соответствуют пику эмиссии при 450 нм.
3. Наибольший цитотоксический эффект наблюдался у 0,15% раствора додецилсульфата натрия и 0,15% олеата натрия. Наименьшую цитотоксичность все стабилизаторы проявляли при 10% объеме от среды.
4. Наибольшим цитотоксичном эффектом обладали НЧ в комплексе с 0,15% раствором OleNa и 0,15% раствором SDS в количестве 400 нг на 100 мкл суспензии клеток.



