

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

Кафедра биохимии и биофизики

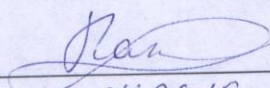
**ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В
ОТНОШЕНИИ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы
Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология
биологического факультета
Соловьева Вадима Юрьевича

Научный руководитель:

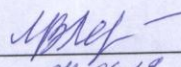
Доцент кафедры биохимии и
биофизики, к.б.н.


04.06.19

М. В. Каневский

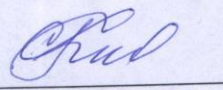
Научный консультант:

ст.н.с. ОНИ НС и БС, к. ф – м. н.


04.06.19

М. В. Ломова

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики, д.б.н., профессор


04.06.19 г.

С. А. Коннова

Саратов 2019

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень разработанности проблемы

Наночастицы серебра на сегодняшний день представляют собой перспективный научный материал. Они нашли применение в диагностике и лечении различных онкологических, противовирусных и др. заболеваний. Используются в фармацевтической промышленности, в медицинских изделиях и медицинских покрытиях для различных устройств, оптических датчиков и косметике. Широко применяются в промышленных, бытовых и потребительских товарах, в пищевой промышленности, в диагностике, ортопедии, доставке лекарств, в качестве противораковых агентов. Наночастицы широко применяются в различных областях человеческой деятельности благодаря своей высокой активности и уникальным антибактериальным свойствам [1,2]. По этим же причинам, наночастицы способны оказывать цитотоксическое действие на клетки эукариот [3].

Наночастицы обладают более высокой токсичностью по сравнению с обычными микрочастицами, способны проникать через клеточные барьеры, циркулировать и накапливаться в органах и тканях. 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 [4]. В связи с этим, исследование цитотоксичности наночастиц представляет большой интерес. Более того наночастицы способны агрегироваться в процессе их производства и использования. Решением проблемы агрегации стало добавление в растворы наночастиц различных стабилизаторов [5]. Поэтому необходимо создавать комплексы стабилизированных наночастиц и выявлять минимальные концентрации для уменьшения цитотоксичности на клетки эукариот.

Были проведены исследования, в ходе которых выявлены наночастицы стабилизированные различными полимерами, которые можно будет рекомендовать для дальнейшего безопасного производства материалов,

обладающих антисептическим действием. Объектом исследования выступали диплоидные фибробласты человека (NHDF).

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлась оценка и описание некоторых физических свойства, а также цитотоксичность стабилизированных наночастиц серебра и их стабилизаторов.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить характеристику морфологии наночастиц серебра сканирующей и просвечивающей электронной микроскопией;
2. Изучить диапазон флюоресцирования наночастиц серебра для выбора красителя фибробластов;
3. Оценить цитотоксический эффект стабилизаторов на нормальные дермальные фибробласты человека;
4. Оценить цитотоксический эффект стабилизированных наночастиц серебра на нормальные дермальные фибробласты человека.

Научная значимость. Полученные в работе результаты перспективны как с практической точки зрения, так и для проведения дальнейших фундаментальных исследований наночастиц серебра. Исследованные полимеры в дальнейшем могут служить в качестве стабилизаторов наночастиц серебра.

Структура и объем работы. Работа изложена на 66 страницах, включает в себя введение, основную часть, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 7 рисунками. Список использованных источников включает 167 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. Представлен анализ литературных данных о свойствах и характеристиках наночастиц серебра, методов синтеза и изучения, механизмах действия на клетки, а также влияние свойств на их токсичность.

Материал и методы исследования. Экспериментальные исследования проводились на базе ОНИ НС и БС СГУ отдела клеточной инженерии.

Используемые в ходе исследования наночастицы серебра, полученные методом химического восстановления, были предоставлены ООО “М9” (патент RU 2 638 716 C2). В качестве стабилизаторов наночастиц серебра использовались следующие полимерные соединения: 0,7% поливиниловый спирт (PVA), 0,15% додецилсульфат натрия (SDS), 0,15% олеат натрия (Ole Na), 0,01% карбоксиметилцеллюлоза (CMC), а также 2% агароза (AgA).

В качестве питательной среды для культуры клеток нормальных дермальных фибробластов человека – NHDF (Normal Human Dermal Fibroblasts) использовалась питательная среда MEM – Minimal Essential Medium (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки – FBS (Sigma-Aldrich, США) и 1% смеси пенициллина и стрептомицина (Sigma-Aldrich, США). Для снятия клеток с культуральной посуды использовался 0,05% трипсин с добавлением ЭДТА (Life Technologies, США). Во всех экспериментах использовалась очищенная вода (удельное сопротивление $> 18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$). Морфологию наночастиц серебра определяли методом сканирующей электронной микроскопией. 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. Изображения ПЭМ были получены с помощью электронного микроскопа Titan 80-300 TEM/STEM (FEI, США).

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

Клеточная линия NHDF была предоставлена лабораторией клеточной инженерии, института наноструктур и биосистем Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского. Культуру клеток выращивали на культуральной посуде с адгезивным покрытием на питательной среде MEM, содержащей 10% FBS и 1%

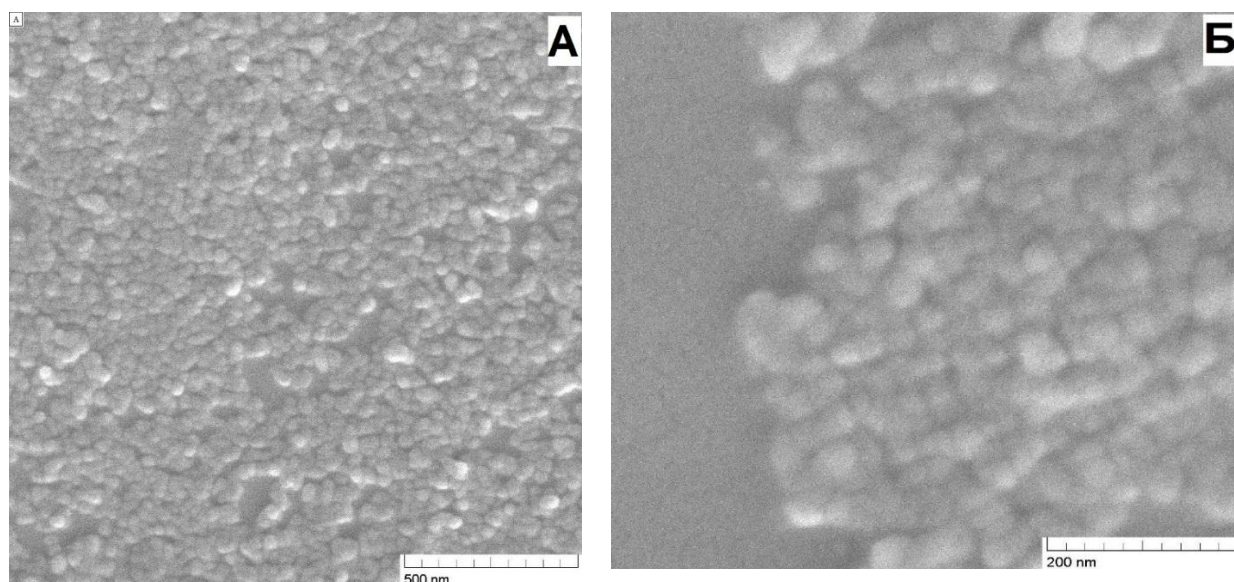
пенициллин-стрептомицинового антибиотика. Среду заменяли каждые 3 дня. Культуру клеток выпрашивали в инкубаторе при 37 °С в газовой среде, содержащей 5% CO₂. После образования монослоя клеточную культуру снимали с культуральной посуды с использованием 0,05% трипсина с добавлением ЭДТА и подсчитывали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

Цитотоксичность стабилизированных наночастиц серебра оценивали на культуре клеток NHDF. Клетки высевали в 96-луночный иммунологический планшет в количестве 10⁴ клеток на лунку. После 24 часов инкубирования к культуре клеток добавляли стабилизированные наночастицы серебра и инкубировали в течении суток. После этого в каждую лунку добавляли 10 мкл флуоресцентного красителя AlamarBlue (Sigma-Aldrich, США). Далее интенсивность флуоресценции красителя (540/560 нм) измеряли с помощью спектрофотометра Synergy H1. В качестве контроля выступали клетки без добавления наночастиц, стабилизаторов и их комплексов. Каждый эксперимент проводили в десятикратной повторности.

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

Результаты исследований. Наночастицы серебра широко используются во многих сферах промышленности благодаря своим уникальным свойствам. Однако, некоторые наночастицы способны агрегироваться во время производства и использования, что может привести к снижению их активности. Кроме того, наночастицы серебра способны оказывать цитотоксический эффект на эукариотические клетки. В связи с этим существует необходимость поиска новых стабилизаторов для наночастиц серебра, которые могли бы предотвратить их агрегацию, не вызывая цитотоксического эффекта. В ходе исследования были оценены некоторые физические свойства и цитотоксичность некоторых полимерных соединений, которые в дальнейшем могут использоваться в качестве стабилизаторов наночастиц серебра.

Данное исследование показывает важность правильного подбора наночастиц, который снизит цитотоксический эффект на клетки эукариот. Для олеата натрия и додецилсульфата натрия в указанной концентрации было установлено использование не более 10% от среды. Также установлено, что для исследования цитотоксичности данных стабилизаторов и их комплексов с наночастицами возможно использовать краситель AlamarBlue. Цитотоксическая активность наночастиц серебра в большей степени зависит от удельной поверхности и, следовательно, от их размера. В связи с этим были оценены размеры наночастиц серебра с помощью СЭМ, ПЭМ и распределение их по размеру с помощью анализа изображений (рисунок 1).



А – Увеличение в 2000 раз, Б – Увеличение в 5000 раз

Рисунок 1 – Сканирующая электронная микроскопия наночастиц серебра

Наночастиц имели диаметр от 18,4 до 33,8 нм. В интервале от 18,4 – 20 нм было найдено 7 частицы. Следующему интервалу соответствуют 11 наночастиц. В отрезке от 21,5 до 23 нанометров было найдено 21 наночастиц. Следующий интервал, от 23 до 24,5 нм, имел 26 наночастиц. Диаметр от 24,5 до 26 нанометров имели 38 наночастиц, а диаметр 26 – 27,5 соответствовал 41 наночастице. В следующем интервале было найдено 31 частицы. Интервалу от

29 до 30,5 нм соответствовали 23 наночастиц, а интервалу от 30,5 до 32 – 6 наночастиц. В последнем интервале, 32 – 33,8 нм, было найдено 4 наночастицы.

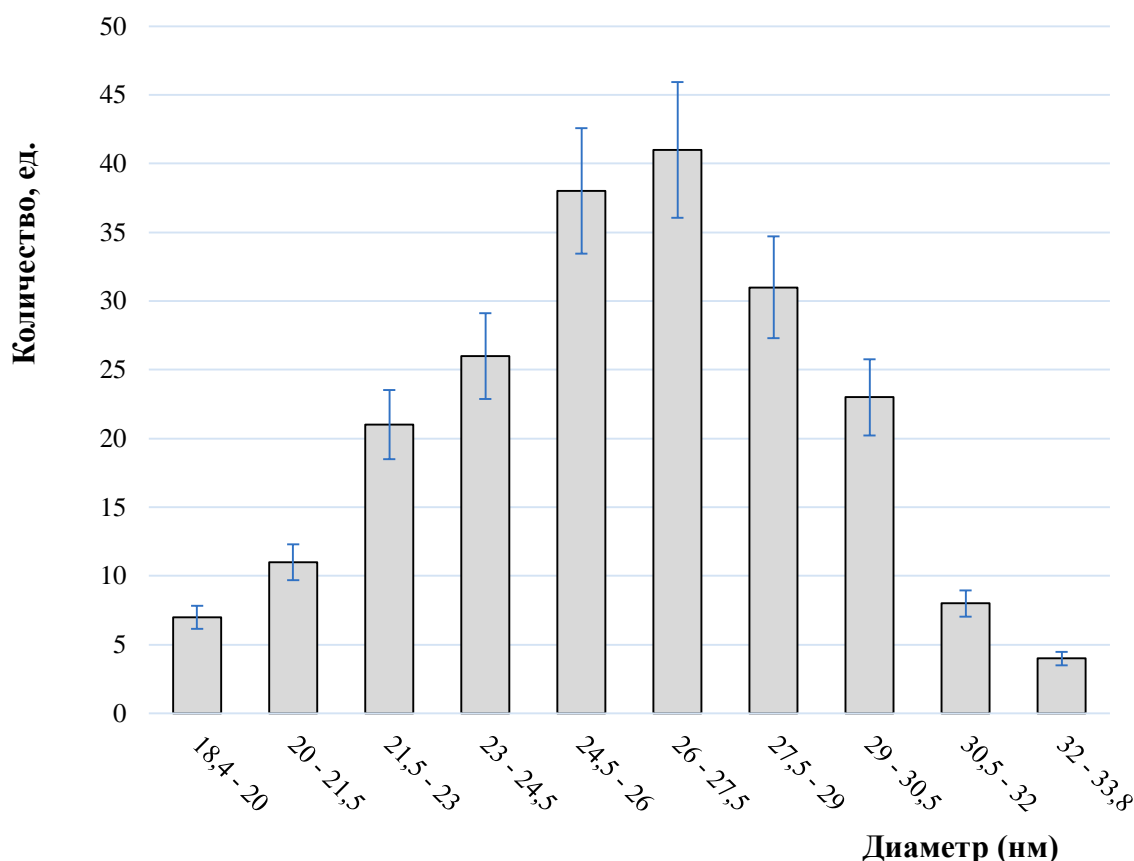


Рисунок 2 – Распределение наночастиц серебра по диаметру

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

Основываясь на результатах, 0,15% раствор поливинилового спирта и 0,01% раствор карбоксиметилцеллюлозы показали хороший потенциал в

качестве стабилизаторов наночастиц. Указанные стабилизаторы проявляли низкую цитотоксический эффект, в отличие, от Ole Na и SDS.

В ходе этого исследования мы оценили форму, размер, флуоресценцию и цитотоксичность наночастиц стабилизированных поливиниловым спиртом, додецилсульфатом натрия, олеатом натрия, карбоксиметилцеллюлозой и агарозой. Таким образом, наночастицы, стабилизированные всеми исследованными полимерными соединениями, за исключением додецилсульфатом натрия, не обладали значительным цитотоксическим действием на клетки фибробластов, что в дальнейшем может служить рекомендацией к их практическому использованию в качестве стабилизаторов наночастиц серебра.

ВЫВОДЫ

1. Было установлено, что наночастицы, использованные в работе, имели сферическую форму и диаметр от 18,4 до 33,8 нм, максимальное число частиц имело размер от 26 до 27,5 нм.
2. Из представленных стабилизаторов только 2% раствор агарозы и наночастицы, стабилизированные агарозой, имели специфический пик эмиссии при 450 нм.
3. Наибольший цитотоксический эффект наблюдался у 0,15% раствора додецилсульфата натрия и 0,15% олеата натрия (30% v/v). Наименьшую цитотоксичность все стабилизаторы проявляли в концентрации 10% v/v.
4. Наибольшим цитотоксическим эффектом обладали наночастицы, стабилизированные 0,15% додецилсульфатом натрия в количестве 500 нанограмм на 100 мкл суспензии клеток.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Handbook on the toxicology of metals / G. Nordberg [et al.] // Academic Press. – 2014. – P. 1024.
2. Ivask, A. Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: a comparative review / A. Ivask, K. Juganson // Nanotoxicology. – 2014. – V. 8. – P. 57–71.
3. Schrand, A. M. Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment / A. M. Schrand, M. F. Rahman // Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. – 2016. – V. 2, № 5. – P. 544–568.
4. Advancing risk assessment of engineered nanomaterials: application of computational approaches / A. Gajewicz [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2017. – V. 64, № 15. – P. 1663–1693.
5. Oberdörster, G. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective / G. Oberdörster, V. Stone, K. Donaldson // Nanotoxicology. – 2007. – V. 1, № 1. – P. 2–25.

