


Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Е.И. Шишацкая

«22» июня 2016 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Тестирование функциональной активности клеток моноцитарного ряда  
*in vitro*

Руководители



подпись, дата


профессор, д.б.н. Е. И. Шишацкая

 24.06.16

подпись, дата

доцент, к.б.н. Н. Г. Мензянова

Выпускник

 24.06.16

подпись, дата

К. В. Сухова

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	6
1 Обзор литературы .....	6
1.1 Наночастицы и наноматериалы – использование в биологии и медицине.....	6
1.2 Биологические эффекты наночастиц.....	14
2 Объекты и методы исследования .....	19
2.1 Объекты исследования.....	19
2.2 Методы исследования .....	19
2.2.1 Метод выделения и культивирования моноцитов и эритроцитов....	19
2.2.2 Метод оценки жизнеспособности клеток (МТТ-тест).....	20
2.2.3 Методы электронно-микроскопического исследования .....	21
3 Результаты .....	22
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....	23

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время наночастицы и наноматериалы широко используются в различных медицинских технологиях: «drug delivery», тераностике, биоинжиниринге тканей и органов. Однако, использование наноматериалов в регенеративных технологиях, диагностике и адресной терапии осложняется цитотоксическими эффектами наноматериалов [1].

Наряду с цитотоксичностью (одним из основных «побочных» эффектов наноматериалов) очень серьезную опасность может представлять активация наночастицами и наноструктурированными материалами систем нерецепторного сигналинга и его эффекторных мишеней. Рецептор-независимый сигналинг – механо-химическая трансляция сигнала, зависящая от кривизны биомембраны. Физические силы, которые возникают в плазматической мембране в процессе интернализации частиц запускают наноразмерные деформации мембраны, которые затем транслируются в химический сигнал, активирующий каскад трансдукции. С системами нерецепторного сигналинга могут быть связаны неоднозначные эффекты наночастиц на липидный метаболизм, процессы дифференцировки и пролиферации клеток [1, 2, 3, 4, 5].

Наконец, биологические эффекты наноматериалов (в частности, их цитотоксичность) могут в значительной степени модифицироваться через формирование белковой «короны»: сорбции различных белков на поверхности наночастиц. Особенности белковой короны определяют пути интернализации, системы внутриклеточного сигналинга и эффекторные мишени: системы липидного метаболизма, окислительно-восстановительного гомеостаза, провоспалительных и противовоспалительных реакций [6, 8, 9, 11].

Цитотоксичность, нерецепторный сигналинг, формирование белковой короны лежат в основе неопределенности «побочных» эффектов наноматериалов и снижают их эффективность как терапевтических агентов и биоимплантов [4, 5, 7].

Это определяет востребованность систем эффективной оценки биологической активности наноматериалов *in vitro*, которые позволяют отбирать наиболее «безопасные» варианты нанокомпозитов и использовать их для дальнейшего функционального инжиниринга.

Кратковременная культура моноцитов (выделенных из периферической крови), как система скрининга наноматериалов, представляется наиболее оптимальным, биологически «оправданным» вариантом. Клиренс наночастиц, процессы биодegradации имплантов на основе нанокомпозитов *in vivo* зависят от функциональной активности системы моноцитов-макрофагов. Более того, простая хорошо воспроизводимая процедура выделения в перспективе позволяет использовать кратковременную культуру моноцитов для оценки индивидуальных особенностей биологических эффектов наноматериалов. Это тем более актуально потому, что функциональная активность моноцитов-макрофагов (например, соотношение фенотипов M1 и M2) *in vitro* значительно варьирует у разных доноров [4, 8, 10].

Как правило, в системах скрининга *in vitro* оценивается влияние исследуемых факторов на некоторые интегральные параметры: жизнеспособность и морфологию клеток. Анализ небольшой группы интегральных параметров вполне достаточен для решения конкретных промежуточных задач и выбора наиболее перспективной группы наноматериалов для дальнейшей функционализации.

В связи с этим изучали возможность использования кратковременной культуры моноцитов для оценки *in vitro* влияния различных типов биополимерных наноматериалов на жизнеспособность и морфологию клеток.

Целью работы было изучение влияния наноалмазов (НА) и фуллеренов (Ф) на структурно-функциональные особенности моноцитов и эритроцитов в условиях кратковременного культивирования *in vitro*.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделение и культивирование моноцитов и эритроцитов *in vitro* в стандартных условиях и в присутствии наночастиц.

2. Оценка жизнеспособности клеток в различных условиях культивирования.

3. Изучение морфологии клеток в различных условиях культивирования.

# ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Наночастицы и наноматериалы – использование в биологии и медицине

Наночастицы представляют собой объекты, размеры которых составляют от 1 до 100 нм. Нанотехнология как наука возникла в тот момент, когда было обнаружено, что химические и физические свойства материалов на наноразмерном уровне в корне отличаются от свойств как свободных атомов или молекул, так и от объёмных форм веществ этих же атомов или молекул. Поэтому в настоящее время наночастицы и наноматериалы за счёт своих уникальных свойств находят широкое применение в различных областях науки, техники и медицины. Появление новых свойств частиц наноразмера обусловлено волновой природой частиц, например, электронов, поэтому их поведение подчинено законам квантовой механики. У нанометровых материалов могут изменяться магнитные, тепло- и электропроводные свойства, например, уменьшается температура плавления, увеличивается скорость диффузии и теплоёмкость, снижается теплопроводность, повышается твёрдость, вязкость, износостойкость [2, 17]. К примеру, наночастицы диоксида кремния обладают хорошей теплоизоляцией, поэтому их используют при производстве термостойких лаков и красок. Частицы золота и серебра в виде отдельных молекул вещества являются химически практически инертными, однако при размере нескольких нанометров они становятся активными катализаторами химических реакций. Субмикронные частицы серебра могут продуцировать активные формы кислорода в биологических системах. А наночастицы оксида цинка и диоксида титана поглощают свет в ультрафиолетовом диапазоне, поэтому их применяют для производства солнцезащитных кремов [1, 7, 12, 13, 16].

Однако кроме использования металлов и их оксидов, в нанотехнологии широко используют и углеродные наноматериалы: наноалмазы, фуллерены и углеродные нанотрубки. Эти материалы обладают рядом следующих характеристик: химическая стойкость, высокая прочность, жёсткость, ударная вязкость, тепло- и электропроводность. Различные способы конструирования наноматериалов позволяют придавать им свойства диэлектриков или полупроводников. Кроме этого возможно наделять НА и Ф металлической проводимостью и высокотемпературной сверхпроводимостью. Все эти уникальные свойства наноматериалов позволяют изготавливать из них электрические провода, сверхпроводящие соединения или устройства [14, 15, 39].

Но кроме этого углеродные НЧ широко применяются в биологии и медицине. Наноалмазы и фуллерены обладают большой площадью поверхности по отношению к объёму частицы, таким образом, на их поверхности можно конъюгировать большое количество химических групп, которые наделяют НА и Ф уникальными свойствами. Например, связывая определённые лекарственные вещества с этими группами, можно использовать НЧ в качестве транспортного средства для адресной доставки лекарств (технологии «drug delivery») [1, 3, 18, 20].

Характеризуя возможности использования нанотехнологий в области медицины, можно отметить три основных направления: применение НЧ в терапии, диагностические процедуры с участием НЧ, а также использование наноматериалов в технологии изготовления различных изделий медицинского назначения [2, 19].

Таким образом, конкретные задачи в сфере нанотехнологий можно разделить на несколько групп: изготовление наноструктурированных материалов (поверхности с нанорельефом, мембраны с наноотверстиями), наночастиц (фуллерены, наноалмазы и углеродные нанотрубки), нанокапсул, производство нанотехнологических сенсоров и анализаторов,

наноинструментов и наноманипуляторов, а также наноустройств различной степени автономности [21, 28].

#### 1. Применение нанотехнологий в терапии.

Доставка лекарственных веществ возможна благодаря тому, что НА имеют размер биологических молекул (белков, ДНК, РНК) и легко транспортируются в кровеносном русле. Успешные модели для доставки лекарств были сконструированы из различных типов НЧ: наноалмазов, фуллеренов и углеродных нанотрубок. Адресная доставка лекарств актуальна для онкологии, дерматологии, кардиологии и гастроэнтерологии. Как было сказано выше, НА способны связывать различные вещества на поверхности, и, попадая в организм, они достигают определённых тканей и клеток, в которых должны действовать эти лекарственные вещества [22, 30]. Это обеспечивает не только локальное действие лекарств, не вредя при этом остальным клеткам (в случае если вещества токсичны для здоровых клеток), но и позволяет доставлять лекарства в определённых концентрациях, не теряя активных веществ на пути к клеткам-мишеням, и сохраняя их конформацию и активность. Так, например, карбоксилированные НЧ, связанные с ферментами или такими веществами, как лизоцим более эффективно уничтожают бактерии. Также при локальном введении наноалмазами инсулина в очаг воспаления, можно снизить действие бактерий после ранений. В настоящее время НА с инсулином вносили в лекарственные мази [23]. В слабощелочной среде происходит диссоциация инсулина от НЧ, и он начинает действовать. То есть высвобождение инсулина происходит именно в очаге воспаления, где развивается инфекционный процесс, так как бактерии защелачивают среду [24, 27, 32].

Среди преимуществ использования НЧ в качестве транспортёра для адресной доставки лекарств можно отметить следующее: во-первых, при использовании наноразмерных переносчиков объем распределения препарата обычно снижается. Во-вторых, происходит снижение токсичности препарата за счет его избирательного накопления в поврежденной ткани и меньшего



поступления в здоровые ткани. В-третьих, многие нанопереносчики увеличивают растворимость гидрофобных веществ в водной среде и, таким образом, делают возможным их парентеральное введение. В-четвертых, системы доставки способствуют повышению стабильности препаратов на основе пептидов, олигонуклеотидов и небольших гидрофобных молекул [29, 41, 43]. На рисунке 1 представлена схема адресной доставки лекарств.



Рисунок 1 – Схема частицы для адресной доставки лекарств

Одним из примеров использования наноструктур для направленной доставки лекарственных препаратов являются нанооболочки. В отличие от углеродных наночастиц, нанооболочки представляют собой несколько более крупные частицы, состоящие из кремнеземной сердцевины и тонкого золотого покрытия [12, 25]. Нанооболочки покрываются слоем полимера, содержащего лекарственный препарат, и вводятся в организм. После накопления частиц в пораженной ткани (например, в опухоли) производится облучение данной области инфракрасным лазером. Это приводит к селективному поглощению нанооболочками инфракрасных частот и их нагреванию. Нагрев поверхности частицы приводит к высвобождению лекарства из слоя полимера и обеспечивает его локальное действие [24, 35, 40].

## 2. Применение нанотехнологий в диагностических целях.

Среди диагностических маркеров, можно отметить квантовые точки. Это полупроводниковые кристаллы нанометрового размера, имеющие уникальные химические и физические свойства, не характерные для тех же веществ в макромасштабе. В недавнее время учеными были получены уникальные флуоресцентные квантовые точки. Эти точки дают намного более мощный отблеск света, чем традиционные красители, и обладают особым биоинертным покрытием, которое, с одной стороны, защищает сами квантовые точки от «нападения» ферментов и других биологических молекул, а с другой – не дает возможности токсичным веществам попасть в организм, что очень важно для диагностики заболеваний [11, 36, 37, 42]. Кроме того, разные группы таких нанометок можно освещать одним общим источником. Квантовые точки широко применяются в диагностических целях. В частности, их можно присоединять к биомолекулам типа антител, пептидов, белков или ДНК. А эти комплексы, в свою очередь, могут быть спроектированы так, чтобы обнаруживать другие молекулы (например, типичные для поверхности раковых клеток) [7, 26, 33, 42].

В одном из опытов квантовые точки селенида кадмия были соединены со специфическим антителом, реагирующим с поверхностью клеток раковой опухоли. Квантовые точки вводили в кровеносную систему мышей, которая разносила их по организму. Нанокристаллы попадали в опухоль и накапливались там (и практически нигде больше), в результате чего опухоль оказалась хорошо различимой визуально [2, 34, 38].

Следующая область применения НЧ в целях диагностики – это использование нанороботов или нанодетекторов в эндокринологии. В настоящее время ведутся многочисленные исследования по возможному внедрению нанороботов в сосуды крови. Забор крови для детекции уровня сахара в крови – универсальный способ, однако он обладает основным недостатком – инвазивностью [5, 10, 34]. Нанороботы могут решить эту проблему. Постоянно находясь в кровеносном русле, эти устройства могут

непрерывно оценивать уровень глюкозы у больных сахарным диабетом. Кроме этого, благодаря нанороботам возможно будет оценивать уровень гликемии в сосудах различных органов, а также сравнивать степень потребления глюкозы различными тканями и распознавать те ткани, в которых в большей степени выражено нарушение захвата глюкозы [13].

Помимо таких областей применения НЧ, как терапия и диагностика, существует и область, сочетающая в себе оба действия (терапию и диагностику) – это, так называемая, тераностика. То есть помимо специфического распознавания наночастицами определённых сайтов, они могут и запускать различные терапевтические процессы [21, 25].

К таким примерам можно отнести тромболизис с помощью ультразвука и нанопузырьков, конъюгированных с активатором плазминогена. Нанопузырьки, попав в кровь, двигаются по кровеносному руслу, при встрече с тромбом они специфически с ним связываются (за счёт химических групп на поверхности этих пузырьков) (=диагностика). После связывания из нанопузырьков высвобождается тканевой активатор плазминогена и запускает процесс тромболизиса (=терапия). А обработка участка ткани ультразвуком ускоряет процесс лизиса [12, 18, 41].

3. Использование наноматериалов в технологии изготовления различных изделий медицинского назначения. Одним из свойств наноструктурированных материалов является возможность создания уникального нанорельефа поверхностей. Установлено, что при моделировании трёхмерных подложек-скаффолдов для формирования клеточного трансплантата, наличие нанорельефа облегчает адгезию клеток к поверхности скаффолда. А модификация поверхности НА (благодаря конъюгации функциональных групп) позволяет активировать пролиферацию клеток, запуская различные сигнальные пути. Таким образом, плёнки из углеродных НЧ обладают преимуществом для создания на их основе 3D структуры для последующего заселения на ней разных типов клеток. Помимо этого, сорбируя на поверхности НЧ такие ферменты, как лизоцим, можно создавать на имплантатах антибактериальные

поверхности, уменьшая тем самым вероятность инфекционного заражения. Кроме того, наноалмазные плёнки повышают коррозионную стойкость имплантатов [36, 40, 42].

4. Конъюгация определённых химических групп на поверхности частиц делает возможным использование НА в адсорбционной хроматографии и ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии). Показано, что карбоксилированные углеродные НЧ могут неспецифично адсорбировать рекомбинантные белки апобеллина и люциферазы.

5. Широко используют НА в качестве нанобиосенсоров. Биотинилированные углеродные НЧ могут прочно связывать белок стрептавидин за счёт химического связывания. Исходя из этого, НА с конъюгированным на поверхности специфичным зондом могут быть использованы для белок-специфической селекции [13, 17, 30].

6. НА используют для создания ДНК-микрочипов, при конъюгации на их поверхности комплементарной ДНК. При связывании кДНК, расположенной на зонде, с искомой последовательностью, происходит гибридизация, которую можно количественно оценить с помощью флуоресценции или хемилюминесценции. Таким образом, можно определить исходное количество ДНК с искомой последовательностью в пробе. ДНК-зондирование используется для нахождения SNP (single nucleotide polymorphism – однонуклеотидных полиморфизмов) или других мутаций, для оценки экспрессии генов, для генотипирования и секвенирования [10,14,29]. Процесс зондирования ДНК показан на рисунке 2.

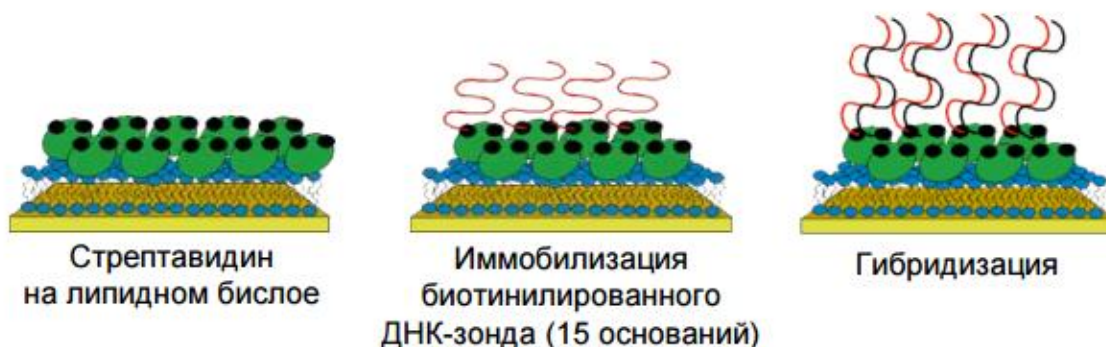


Рисунок 2 – Использование НА в качестве нанобиосенсора

7. Также НА находят применение в качестве подложек для масс-спектрометрии. Наноалмазы с адсорбированным поли-L-лизином могут отделять от белков олигонуклеотиды за счёт электростатических сил [33].

8. Адсорбционные свойства НА используют в медицине для сорбции находящихся в организме токсинов, представляющих угрозу для жизни человека, которые не могут быть изъяты с помощью энтеросорбентов. Например, такой токсин грибов, как афлатоксин не доступен для энтеросорбентов, но он может быть сорбирован углеродными НЧ [37].

9. Углеродные наночастицы используют для белкового и генетического анализа в МАЛДИ (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) масс-спектрометрии в силу того, что для ионного лазера НЧ оптически прозрачны [25].

10. НА частицы применяются для доставки ДНК-векторов. НА, связанные с ДНК-плазмидами, доставляются в клетки биобаллистическим методом. А для отслеживания НЧ в клетке, к ним присоединяют флуорофоры, делая процесс более наглядным. Благодаря присоединению флуорофоров можно исследовать как внутриклеточные процессы, так и процессы, происходящие внутри организма в целом. Например, добавляя НЧ с флуоресцентной меткой в зиготу, можно наблюдать развитие организма [3,12].

11. Благодаря поглощению наноалмазами ультрафиолетового излучения, за счёт специфических свойств кристаллической решётки, они находят применение в солнцезащитных средствах [37].

В настоящее время существуют данные об относительной биосовместимости и биотропности наночастиц, однако этих данных недостаточно для того, чтобы исключить любую цитотоксичность НЧ. Механизмы взаимодействия наночастиц с клетками не до конца изучены. Поэтому сейчас широко исследуются эффекты наночастиц *in vitro* [15, 21].

## **1.2 Биологические эффекты наночастиц**

Хотя углеродные наноматериалы являются химически инертными, они не инертны в биологическом отношении.

В настоящее время проводятся исследования, нацеленные на изучение захвата НА клетками различной природы. Однако пока эти исследования очень фрагментарны. По некоторым данным считается, что наночастицы проникают в клетку эндоцитозом (клатрин-зависимым и кавеолин-зависимым), по другим данным возможны и другие способы: пиноцитоз, фагоцитоз или проникновение через липидный бислой мембраны напрямую. Все эти способы зависят от размера НЧ, а также от вида клетки, в которую они попадают [36, 42].

Когда НЧ проникают внутрь клеток, они способны взаимодействовать с органоидами клетки, внутриклеточными белками и нуклеиновыми кислотами, что может приводить к нарушению сигналинга, пролиферации и других клеточных процессов.

Некоторые НЧ активируют развитие воспаления из-за повреждения мембран лизосом, а вследствие повышенного выброса клетками гидролитических ферментов, а также из-за повышения экспрессии генов провоспалительных медиаторов и цитокинов.

Взаимодействие наночастиц с клетками может приводить к изменению их функционального состояния в том случае, когда НЧ неспецифически запускают различные сигнальные пути. По литературным данным НЧ могут запускать сигнальные пути с участием митоген-активируемой протеинкиназы, с участием фосфоинозитид-3-киназы и путь с участием транскрипционного фактора NF-

кВ. Эти сигнальные пути отвечают за экспрессию генов, приводящих к пролиферации клеток, к запуску воспалительных реакций и к апоптозу. Однако в настоящее время неизвестен механизм запуска наночастицами этих процессов [17, 36, 42].

Но для того, чтобы НЧ нашли широкое применение, необходимо изучить их взаимодействие с биологическими системами, их возможную цитотоксичность.

Пути цитотоксичности наночастиц очень вариативны, они зависят от природы наночастиц и их химического окружения в виде функциональных групп, а также от структуры и состава биологической мембраны. Поэтому воздействие НЧ часто изучается на модельных мембранах.

В настоящее время изучают взаимодействие углеродных наночастиц с модельной мембраной, а именно с фосфолипидным бислоем. Изучена возможность индуцированного наночастицами нарушения биологической мембраны, за счёт нерцепторного физического взаимодействия, за счёт интеграции НЧ в мембрану или за счёт запуска ими перекисного окисления липидов [25].

Накопление НЧ в мембране. Было обнаружено, что гидрофобные и амфифильные НЧ могут с лёгкостью проникать в мембрану, благодаря притяжению гидрофобными липидными хвостами. Химическая природа НЧ и мембранных составляющих позволяет частицам надолго задерживаться в мембране, что приводит к негативному эффекту НЧ на биологические системы. Деформация мембраны, происходящая при транспорте НЧ, обусловлена гидрофобным взаимодействиям НЧ с липидными гидрофобными хвостами. Обнаружено, что деформации в мембране возникают ещё до того, как НЧ достигает корового региона мембраны. Следовательно, НЧ могут приносить вред мембране во время проникновения в неё. Также было обнаружено, что ориентация функционализированных амфифильных наночастиц влияет на деформацию мембраны, за счёт взаимодействия функциональных групп НЧ с липидами в центре бислоя [25, 36, 39]. Это подразумевает то, что ориентация

НЧ представляет дополнительный энергетический барьер для транспорта НЧ. Активация наночастицами механо-химического сигналинга обусловлена механическими воздействиями наночастиц на поверхность мембраны клеток. Схематично процесс активации механо-химического сигналинга представлен на рисунке 3.

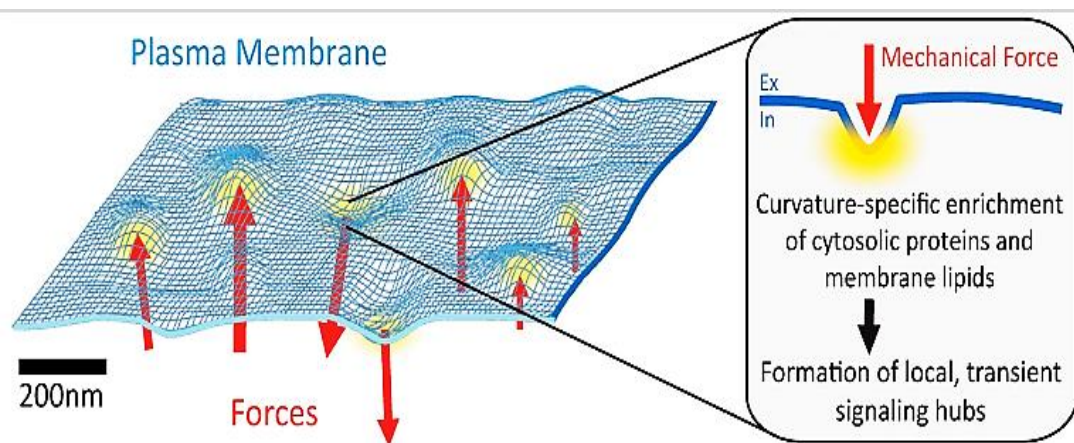


Рисунок 3 – Активация наночастицами механо-химического сигналинга

Выявлено, что НЧ, включенные в мембрану, приводят к её «размягчению», которое становится тем больше, чем выше концентрация НЧ. Профиль латерального давления внутри мембраны отражает эффекты НЧ на функциональную активность мембранных белков. Локальные возмущения в латеральном давлении, опосредованные интеграцией НЧ в мембрану, приводят к изменению функционального состояния мембранных белков [25, 36, 39].

Нереактивное физическое взаимодействие НЧ с мембраной приводит к нарушению её целостности. Физическое взаимодействие НЧ с мембраной обусловлено модификациями заряда и положения функциональных групп на частице. НЧ могут активировать нерецепторный, механо-химический сигналинг. При взаимодействии НА с мембраной возникают локальные изменения в микрорельефе, создающие чрезмерное физико-химическое напряжение, которое активирует мембраносвязанные фосфолипазы. Деградация мембранных фосфолипидов сопровождается морфологическими изменениями мембраны из-за нарушения её целостности. Кроме этого через



механо-химический сигналинг могут реализоваться и перестройки клеточного цитоскелета [12, 25, 36, 39].

Интеграция НЧ в мембрану приводит к перекисному окислению липидов, которое в свою очередь приводит к возмущению внутренних структур мембраны, к её «размягчению» и повышению мембранных флуктуаций.

Один из возможных механизмов нарушения клетки предполагает индуцированный наночастицами оксидативный стресс и последующее перекисное окисление липидов. Активные формы кислорода, предшественники перекисных реакций, наблюдались в клетках, подвергнутых влиянию углеродных наночастиц. Активные формы кислорода продуцируют липидные радикалы, которые реагируют с другими липидами, приводя к перекисному окислению в мембране и последующему нарушению мембраны [25, 36, 39]. Цитотоксические эффекты наночастиц представлены на рисунке 4.

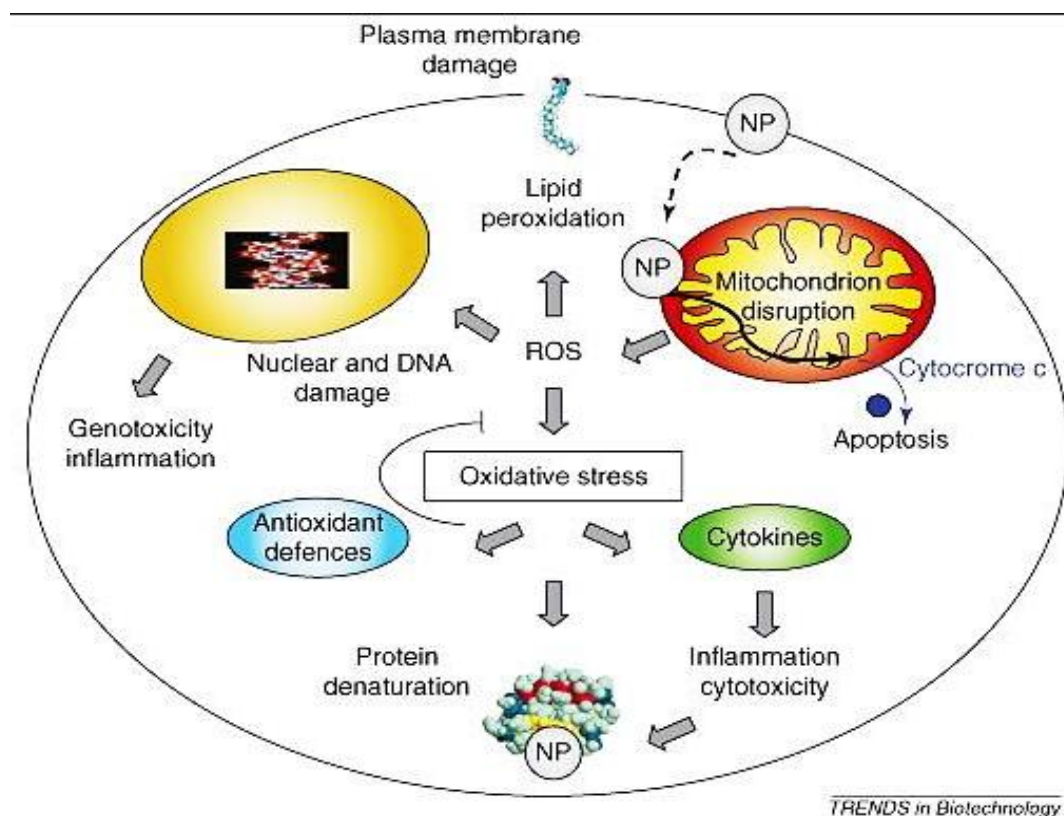


Рисунок 4 – Цитотоксические эффекты наночастиц

Таким образом, можно заметить, что существует связь между функциональным состоянием клеток, изменённым под действием НЧ, и их морфологией. Из этого следует, что морфологический критерий можно применять для оценки влияния НЧ на клетки [25, 36, 39].

## **2 Объекты и методы исследования**

### **2.1 Объекты исследования**

Объектом исследования были моноциты и эритроциты, выделенные из крови здоровых доноров.

### **2.2 Методы исследования**

#### **2.2.1 Метод выделения и культивирования моноцитов и эритроцитов**

Выделение моноцитов.

Кровь собирали в пробирки с раствором ЭДТА (2 мг ЭДТА/мл крови). Кровь центрифугировали при 600 g, 15 мин. Плазму декантировали. Собирали лейкоцитарную массу. После сбора лейкоцитарной массы осадок эритроцитов 2 раза промывали средой DMEM. Клеточные осадки эритроцитов суспендировали в среде DMEM с 10% фетальной сывороткой.

Моноциты из лейкоцитарной массы выделяли на гипертономическом градиенте плотности фиколл-урографин по методу Recalde H.R. (1984). Выделенные моноциты суспендировали в среде DMEM с фетальной сывороткой.

В контрольных вариантах клеточные суспензии моноцитов и эритроцитов вносили в 96-луночные культуральные планшеты ( $10^5$  клеток на лунку), на дне лунок находились стерильные биополимерные подложки.

В экспериментальных вариантах в лунки дополнительно вносили аликвоты НА и Ф разной концентрации до конечной концентрации 2.5, 25, 50 мкг/мл. Для оценки эффектов белковой «короны» НА и Ф предварительно инкубировали с фетальной сывороткой 5 мин и затем вносили в клеточные суспензии до конечной концентрации 2.5, 25, 50 мкг/мл.

Клетки культивировали 36 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C.

Ниже представлены варианты культивирования клеток ( $10^5$  клеток на лунку).

1. Подложка из биополимера, среда DMEM с фетальной сывороткой.
2. Подложка из биополимера, среда DMEM с фетальной сывороткой, НА в конечной концентрации 5, 25, 50 мкг/мл.
3. Подложка из биополимера, среда DMEM с фетальной сывороткой, Ф в конечной концентрации 5, 25, 50 мкг/мл.
4. Подложка из биополимера, среда DMEM с фетальной сывороткой, НА с белковой короной в конечной концентрации 5, 25, 50 мкг/мл.
5. Подложка из биополимера, среда DMEM с фетальной сывороткой, Ф с белковой короной в конечной концентрации 5, 25, 50 мкг/мл.

Биополимерные подложки из полигидрооксиалконоатов были получены из лаборатории Хемоавтотрофного синтеза института Биофизики РАН, руководитель профессор Т.Г. Волова.

Стабильные водные суспензии углеродных наночастиц, наноалмазов и фуллеренов, были предоставлены А.П. Пузырем, лаборатория Биотехнологии и биолюминесценции Института Биофизики РАН.

Средний диаметр наноалмазов  $54,07 \pm 0,35$  nm, индекс полидисперсности  $PdI = 0,225 \pm 0,005$ .

Средний диаметр фуллеренов  $94,64 \pm 3,12$  nm, индекс полидисперсности  $PdI = 0,482 \pm 0,031$ .

### **2.2.2 Метод оценки жизнеспособности клеток (МТТ-тест)**

Потенциальную цитотоксичность наночастиц оценивали в реакции с МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромидом). Через 36 ч инкубации в лунки планшета вносили раствор МТТ (5мг/мл) до конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали 4 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. После

завершения инкубации отбирали среду и растворяли кристаллы формазана в ДМСО. Из лунок аликвоты переносили в новый планшет и определяли оптическую плотность при длине волны 570 нм. Оптическую плотность контрольных вариантов принимали за 100%, жизнеспособность экспериментальных вариантов выражали в процентах от контроля.

### **2.2.3 Методы электронно-микроскопического исследования**

После завершения инкубации из лунок планшета удаляли культуральную среду и фиксировали клетки в лунках планшета 2,5% глутаровым альдегидом (приготовленном на фосфатном буфере, pH=7,4). Через 1 час клеточные образцы отмывали от глутарового альдегида 0,1 М фосфатным буфером и фиксировали 1% OsO<sub>4</sub> в течение 1ч при комнатной температуре. Клеточные образцы несколько раз промывали 0,1М фосфатным буфером и обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации, затем в 100% ацетоне. Образцы напыляли золотом и анализировали с помощью сканирующего микроскопа ТМ 3000.

### **3 Результаты**

Из текста ВКР изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Galic, M. Force-control at cellular membranes / M. Galic, I. Begemann, A. Viplav, M. Matis // *Bioarchitecture*. – 2014. – № 4(4-5). – P. 164-168
2. Bharde, A. Magnetic nanoparticles as mediators of ligand-free activation of EGFR signaling / A. Bharde [et al.] // *Public Library of Science One*. – 2013. – № 8(7): e68879
3. Lee, J.H. Magnetic nanoparticles for ultrafast mechanical control of inner ear hair cells / J.H. Lee [et al.] // *American Chemical Society Nano*. – 2014. – № 8(7) – P. 6590-6598
4. Curtis, A.S. Epigenesis: roles of nanotopography, nanoforces and nanovibration. / A.S. Curtis, P.M. Tsimbouri // *Expert Review of Medical Devices*. – 2014. – № 11(4). – P. 417-423
5. Henstock, J. Controlled mechanotransduction in therapeutic MSCs: can remotely controlled magnetic nanoparticles regenerate bones / J. Henstock, A. Haj // *Regenerative Medicine*. – 2015. – № 10(4) – P. 377-380
6. Henstock, J. Remotely activated mechanotransduction via magnetic nanoparticles promotes mineralization synergistically with bone morphogenetic protein 2: applications for injectable cell therapy / J. Henstock [et al.] // *Stem Cells Translational Medicine*. – 2014. – № 3(11) – P. 1363-1374
7. Kilinc, D. Bio-nano-magnetic materials for localized mechanochemical stimulation of cell growth and death / D. Kilinc, C.L. Dennis, G.U. Lee // *Advanced Materials*. – 2016. – doi: 10.1002/adma.201504845
8. Fleischer, C.C. Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes / C.C. Fleischer, C.K. Payne // *Accounts of Chemical Research*. – 2014. – № 47(8). – P. 2651-2659
9. Mortimer, G.M. Cryptic epitopes of albumin determine mononuclear phagocyte system clearance of nanomaterials / G.M. Mortimer [et al.] // *American Chemical Society Nano*. – 2014. – № 8(4) – P. 3357-3366

10. Hata, K. Evaluation of silica nanoparticle binding to major human blood proteins / K. Hata [et al.] // *Nanoscale Research Letters*. – 2014. – № 9(1) – P. 2493
11. Shannahan, J.H. A hyperspectral and toxicological analysis of protein corona impact on silver nanoparticle properties, intracellular modifications, and macrophage activation / J.H. Shannahan, R. Podila, J.M. Brown // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – № 10 – P. 6509-6521
12. Matczuk, M. Speciation of metal-based nanomaterials in human serum characterized by capillary electrophoresis coupled to ICP-MS: a case study of gold nanoparticles / M. Matczuk [et al.] // *Metallomics*. – 2015. – № 7(9) – P. 1364-1370
13. Di Silvio, D. Effect of protein corona magnetite nanoparticles derived from bread in vitro digestion on Caco-2 cells morphology and uptake. / D. Di Silvio [et al.] // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 2015. – S1357-2725
14. Zanganeh, S. Protein corona: opportunities and challenges / S. Zanganeh [et al.] // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. – 2016. – S1357-2725
15. Polyak, B. How can we predict behavior of nanoparticles in vivo / B. Polyak, B. Cordovez // *Nanomedicine*. – 2016. – doi:10.2217/nnm.15.192
16. Berridge, M. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction / M. Berridge, A. Tan // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1993. – № 303 (2). – P. 474-482.
17. Berridge, M. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts / M. Berridge, A. Tan, K. McCoy, R. Wang // *Biochemica*. – 1996. – № 4. – P. 14-19
18. Brown, S. Monocyte-derived dendritic cells from chronic myeloid leukaemia have abnormal maturation and cytoskeletal function that is associated with defective localisation and signalling by normal ABL1 protein / S. Brown [et al.] // *European journal of haematology*. – 2014. – № 93(7). – P. 96-102
19. Chalkiadaki, G. PKCa/JNK signaling pathway inducing actin cytoskeleton changes / G. Chalkiadaki [et al.] // *Cancer Letter*. – 2011. – № 312(2). – P. 235-244



20. Chalkiadaki, G. Heparin plays a key regulatory role via a p53/FAK-dependent signaling in melanoma cell adhesion and migration / G. Chalkiadaki [et al.] // *IUBMB Life*. – 2011. – № 63(2). – P. 109-119

21. Di Cosmo-Ponticello, C.J. MIF inhibits monocytic movement through a non-canonical receptor and disruption of temporal Rho GTPase activities in U-937 cells. / C.J. Di Cosmo-Ponticello [et al.] // *Cytokine*. – 2014. – № 69(1). – P. 47-55

22. Echarri, A. Caveolae - mechanosensitive membrane invaginations linked to actin filaments / A. Echarri, M.A. Del Pozo // *Journal of Cell Science*. – 2015. – № 128(15). – P. 2747-2758

23. Farokhzad, O.C. Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities / O.C. Farokhzad, R. Langer // *Advanced drug delivery reviews*. – 2006. – № 58(14). – P. 1456-1459

24. Gomez, T.S. T cell activation and the cytoskeleton: you can't have one without the other / T.S. Gomez, D.D. Billadeau // *Advances in immunology*. – 2008. – № 97. – P. 1-64

25. Khalili, F. J. A Review of molecular mechanisms involved in toxicity of nanoparticles / F.J. Khalili, S. Jafari, M.A. Eghbal // *Advanced pharmaceutical bulletin*. – 2015. – № 5(4) – P. 447-454

26. Klotzsch, E. Do mechanical forces contribute to nanoscale membrane organisation in T cells? / E. Klotzsch [et al.] // *Biochimica et biophysica*. – 2015. – № 1853(4) – P. 822-829

27. Marshall, N.J. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function / N.J. Marshall [et al.] // *Growth Regulation*. – 1995. – № 5(2) – P. 69-84

28. Mikołajczyk, T.P. Heterogeneity of peripheral blood monocytes, endothelial dysfunction and subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus / T.P. Mikołajczyk [et al.] // *Lupus*. – 2016. – № 25(1) – P. 18-27

29. Parameswaran, S. Scanning electron microscopy preparation protocol for differentiated stem cells / S. Parameswaran, R.S. Verma // *Analytical biochemistry*. – 2011. – № 416(2) – P. 186-190
30. Recalde, H.R. A simple method of obtaining monocytes in suspension / H.R. Recalde // *Journal of Immunological Methods*. – 1984. – № 69(1) – P. 71-77
31. Safi, W. Differentiation of human CD14+ monocytes: an experimental investigation of the optimal culture medium and evidence of a lack of differentiation along the endothelial line / W. Safi [et al.] // *Experimental and molecular medicine*. – 2016. – № 48:e227 – doi: 10.1038/emm.2016.11.
32. Shishatskaya, E.I. Investigation in vivo of films made of resorbable polyhydroxyalkanoates with different composition: tissue reaction and kinetics of biodestruction / E.I. Shishatskaya, [et al.] // *Cell transplantation and tissue engineering*. – 2012. – № 7 – P. 73-80
33. Stansfield, B.K. Clinical significance of monocyte heterogeneity / B.K. Stansfield, D.A. Ingram // *Clinical and Translational Medicine*. – 2015. – doi: 10.1186/s40169-014-0040-3
34. Valappil S.P. Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates, an overview of animal testing and in vivo responses / S.P. Valappil [et al.] // *Expert Rev. Med. Devices*. – 2006. – № 3(6) – P. 854-868
35. Williams, S.F. PHA applications: addressing the price performance, issue I / S.F. Williams [et al.] // *Tissue engineering International Journal of Biological Macromolecules*. – 1999. – № 25 – P. 111–121
36. Chen, K.L. Nanoparticles meet cell membranes: probing nonspecific interactions using model membranes / K.L. Chen, G.D. Bothun // *Environmental Science and Technology*. – 2014. – № 48(2) – P. 873-880
37. Киروشка, В.В. Синтез, биологическая активность и цитотоксичность нанопорошков на основе  $Fe_3O_4$  / В.В. Киروشка [и др.] // *Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии*. – 2010. – Т.8, № 4 – С. 873-880

38. Беленков, Е.А. Наноалмазы и родственные углеродные наноматериалы : науч.изд. / Е.А. Беленков, В.В. Ивановская, А.Л. Ивановский. – Екатеринбург : Компьютерное моделирование, 2008. – 169с.

39. Нецадим, Д.В. Исследование влияния наноразмерных алмазных частиц на функциональный статус макрофагов *in vitro* : дис. ... канд. биол. наук : 03.03.04 / Дмитрий Владимирович Нецадим. – Новосибирск, 2015. – 136 с.

40. Подлегаева, Л.Н. Свойства наночастиц серебра, полученных восстановлением из растворов и термическим напылением в вакууме / Л.Н. Подлегаева [и др.] // Ползуновский вестник. – 2009. – № 3 – С. 376-380

41. Adams, R. L. P. Cell culture for biochemists / R. L. P Adams. – Glasgow : Biomedical Press, 1983. – 263 с.

42. Нанотехнологии и наноматериалы : учеб. пособие / Н.А. Азаренков [и др.]. – Харьков, 2009. – 69 с.

43. Горюнов, А.С. Морфология и агрегация эритроцитов в нанодисперсиях углерода / А.С. Горюнов [и др.] // Труды Карельского научного центра РАН. – 2009. – № 3 – С. 30-37