

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «САРАТОВСКИЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра материаловедения, технологии
и управления качеством

**СОЗДАНИЕ БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ
КОРТИЗОЛА МЕТОДОМ ГКР**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

магистранта 2 курса 209 группы
по направлению 22.04.01 «Материаловедение и технологии материалов»,
профиль «Материаловедение фармацевтического и медицинского назначения»
факультета нано- и биомедицинских технологий
Балашовой Ольги Олеговны

Научный руководитель
профессор, д.х.н,
профессор

должность, уч. степень, уч.
звание

подпись, дата

Д.А. Горин

инициалы, фамилия

Консультант
д.ф.-м.н

должность, уч. степень, уч.
звание

подпись, дата

А. М. Яценюк

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой
д.ф.-м.н., профессор

должность, уч. степень, уч.
звание

подпись, дата

С.Б. Вениг

инициалы, фамилия

Саратов 2018

Введение. Вся жизнедеятельность человека, его развитие и регулирование организма представляет собой тонкий процесс и контролируется с помощью гормональной системы. Все железы, вырабатывающие гормоны тесно взаимодействуют между собой и нервной системой организма [1].

Значение гормональной системы очень велико, взаимодействуя через рецепторы, гормоны передают информацию от одного органа в другой для достижения баланса в организме. Гормоны являются катализаторами химических реакций, проходящих в организме и необходимых для развития и получения энергии в клетках. Гормоны управляют всеми функциями организма.

При дисбалансе гормонов в организме резко наблюдается ухудшение общего самочувствия, нестабильное эмоциональное состояние, угнетение функций организма. Причины гормонального дисбаланса могут быть различными: генетическая предрасположенность, ослабление иммунитета, перенесенные инфекции и частые стрессы [1].

Наиболее важным гормоном глюкокортикоидной природы является кортизол, который воздействует на многочисленные физиологические и патологические процессы [2]. Измерение кортизола является необходимой мерой для лиц, подверженных его усиленной выработке, во время долгих стрессовых ситуаций, занятий спортом и т.д.

Не менее важный интерес представляет кортизол как биомаркер, детектирующий ряд состояний, таких как посттравматическое стрессовое расстройство, синдром Кушинга, болезнь Аддисона и другие. Один имплантируемый биосенсор, способный в режиме реального времени контролировать концентрации кортизола в организме человека может произвести революцию в диагностике и лечении этих расстройств, а также обеспечивают бесценный инструмент исследования [2].

Своевременная и быстрая диагностика гормонального дисбаланса является важной задачей. Это помогло бы предотвратить неблагоприятные

последствия заболеваний, вызванных из-за нарушения концентрации гормонов в клетках крови.

Целью выпускной квалификационной работы явилось создание биосенсора для определения концентрации гормона кортизола методом гигантского комбинационного рассеяния.

На основе поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- изучение теоретического материала по темам: глюкокортикоиды, кортизол, методы определения гормонов в клетках крови, комбинационное рассеивание, гигантское комбинационное рассеяние;

- изучить разделение частиц и определение степени диффузии красителя Rhodamine B через фильтр из полиамида;

- детектировать образцы из полиамидного фильтра с красителем Rhodamine B с помощью метода КР и ГКР;

- исследовать гидрокортизон с помощью метода КР и ГКР.

Дипломная работа занимает 51 страницу, имеет 31 рисунок и 1 таблицу.

Обзор составлен по 36 информационным источникам.

Во введении рассматривается актуальность работы, устанавливается цель и выдвигаются задачи для достижения поставленной цели.

Первый раздел представляет собой литературный обзор и состоит из следующих подразделов: понятие «глюкокортикоиды» и их свойства, определение кортизола и его биологическое значение, методы определения гормонов, виды гигантского комбинационного рассеяния, спектры комбинационного рассеяния кортизола.

Во втором разделе работы представлены практические работы и полученные данные по темам: метод разделения частиц и определение степени диффузии красителя Rhodamine B через фильтр из полиамида, исследование степени диффузии красителя Rhodamine B через фильтр из полиамида на флуоресцентном микроскопе, исследование образцов фильтра из полиамида с красителем Rhodamine B на Рамановском микроскопе, приготовление раствора с нанозвездами, детектирование образцов из полиамидного фильтра с

красителем Rhodamine В с помощью метода ГКР, исследование гидрокортизона с помощью метода КР, приготовление растворов гидрокортизона с разными концентрациями, исследование полученных образцов с помощью метода КР, исследование гидрокортизона с помощью метода ГКР, исследование гидрокортизона с помощью метода ГКР с использованием волокон с золотыми наночастицами, исследование гидрокортизона с помощью метода ГКР на нанозвездах с карбонатом кальция, приготовление нанозвезд, стабилизированных карбонатом кальция, исследование гидрокортизона на нанозвездах, стабилизированных карбонатом кальция.

Основное содержание работы

Прямая зависимость биологического воздействия от концентрации гормона в крови делают данную научную работу актуальной в сферах медицинской диагностики.

Гормоны – это биологически активные вещества органической природы, которые вырабатываются в клетках желез внутренней секреции. Гормоны поступают в кровь, где избирательно связываются с рецептором клетки-мишени. Гормоны регулируют обмен веществ и разные функции организма [3].

Гормоны переносятся кровью и служат гуморальными регуляторами жизненно необходимых процессов в различных органах и системах организма [4].

По химическому строению выделяют основные классы гормонов:

1. Стероидные гормоны
2. Производные полиеновых (полиненасыщенных) жирных кислот
3. Производные аминокислот
4. Белково-пептидные соединения

Стероидные гормоны – это класс физиологически активных веществ, контролирующие процессы жизнедеятельности человека и животных. Среди них выделяют половые гормоны, кортикостероиды и другие [5,6].

Класс стероидных гормонов обладает высокой липофильностью. Стероиды могут легко проходить через плазматическую мембрану в кровь к клеткам-мишеням [4].

Кортикостероиды вырабатываются в организме исключительно корой надпочечников и обладают глюкокортикоидной активностью. Глюкокортикоиды обладают разносторонним действием на организм, оказывают антистрессовое и противошоковое действие [3].

При столкновении со стрессором, организм должен дать ответ на вызов и инициирует выброс каскада гормонов. В этот момент в коре надпочечников стимулируется секреция кортизола ($C_{21}H_{30}O_5$) (рис. 3) — глюко-кортикоидного гормона стероидной природы [3].

Кортизол является основным и наиболее активным естественным глюкокортикоидом человека. При стрессе и шоковых состояниях концентрация кортизола в крови резко возрастает [4].

Действие кортизола вызывает различные физиологические, когнитивные и поведенческие изменения, имеющие решающее значение для успешной адаптации к стрессу [4].

В условиях стресса, нервной ткани требуется усиленное питание, которое обеспечивается за счет синтеза глюкозы из неуглеводных предшественников. Часть белков скелетной мускулатуры под воздействием кортизола распадается до аминокислот — субстрата для последующего глюконеогенеза. При этом в печени стимулируется активность ряда ферментов, благодаря которым продукты распада белков используются для синтеза глюкозы. Концентрация сахара в крови возрастает, а поскольку параллельно утилизация углеводов мышцами снижается, организм получает дополнительные ресурсы для поддержания активно действующей нервной ткани [4].

В ответ на действие стрессора (например, хирургическое вмешательство) соотношение белковосвязанной и свободной форм изменяется: вдвое снижается количество связанного кортизола, тогда как содержание общего возрастает на

55—100%. При этом на содержание общего кортизола в крови влияет целый ряд факторов [4].

Гормон кортизол оказывает влияние на поведение, настроение, возбудимость и даже на электрическую активность нейронов мозга. Изменение поведения, настроения и общего психо-эмоционального состояния часто наблюдается в случаях повышенного или пониженного содержания кортизола. Например, расстройства сна наблюдаются при пониженном, так и при повышенном уровне кортизола.

При изучении кортизола играет роль сезонные и суточные циклы, стадии развития человеческого организма (половое созревание). Создание биодатчика для измерения кортизола и других глюкокортикоидов необходимый клинический и научный инструмент [2].

Выделение и качественный анализ гормонов производят многими методами. Их подразделяют на четыре основные группы: биологические, химические, иммунологические и методы сатур анионного анализа. Классификация методов определения гормонов в значительной мере условна, так как многие из них являются комбинированными [3].

Важным условием оценки методов определения гормонов является адекватность их показателей с фактическим содержанием гормонов в организме. Определение содержания белковых, полипептидных гормонов и производных аминокислот в гипофизе, щитовидной и других железах должно осуществляться с учетом концентрации гормонов в инкретирующих органах и в крови, так как синтез, депонирование и инкреция упомянутых гормонов регулируются разными механизмами. Синтезирующиеся в надпочечниках и гонадах стероидные гормоны не депонируются, содержание этих гормонов в железах адекватно отражает их биосинтез и инкрецию. Методы прямого определения гормонообразования в соответствующих органах имеют преимущества, однако для исследований чаще применяют более доступные косвенные методы. Для более полной характеристики функциональной деятельности эндокринных желез, некоторые авторы рекомендуют применять

комплексную оценку с учетом их функциональной активности, состояния механизмов регуляции и интенсивности инактивации и выделения гормонов из организма [4].

Уровень концентрации в крови кортизола изменяется в зависимости от времени суток и менструального цикла (у женщин), поэтому необходимо знать оптимальное время для сдачи анализа крови для проверки уровня кортизола [4].

Нормальные показатели – от 230 до 750 нм/л. Понижение концентрации свидетельствует о недостаточности надпочечников в хронической фазе или болезни Аддисона. Снижение показывает возможный рак надпочечников либо аденому [5].

Спектроскопия КР позволяет неинвазивно получать уникальную информацию о конформации и микроокружении молекул внутри живых клеток. Метод КР имеет свои ограничения, из-за низкой интенсивности сигнала.

Самый мощный способ добиться усиления сигнала КР – поместить молекулу вблизи наночастиц благородных металлов. Существуют два способа: поместить наночастицу (НЧ) на поверхность иглы атомно-силового микроскопа и зондировать исследуемые молекулы, регистрируя с них сигнал КР. Этот способ имеет название TERS (Tip Enhanced Raman Spectroscopy). Во втором способе исследуемые молекулы помещают на поверхность НЧ металла и регистрируют КР обычным способом. Этот метод называется гигантское комбинационное рассеяние (ГКР) или SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy).

По мнению большинства ученых, ГКР – самая успешная разновидность КР, которая позволяет получать наибольшее усиление сигнала.

Использование гигантского комбинационного рассеяния для идентификации многокомпонентных структур затруднительно. Для успешного проведения анализа следует предварительно использовать методы разделения компонентов. Для этой цели был использован метод пространственного разделения красителя Rhodamine B за счет разной скорости диффузии частиц через фильтр из полиамида. Целью данного эксперимента являлось

обнаружение оптимальной толщины фильтра из материала полиамид, через который будет проходить раствор с красителем Rhodamine B.

В дальнейших экспериментах для усиления сигнала в качестве подложки были использованы волокна, которые представляют собой фторопласты, модифицированные золотыми наночастицами и модифицированные частицы карбоната кальция золотыми нанозвездами [7-9].

Заключение. Спектроскопия комбинационного рассеяния – это метод, дающий информацию о химическом составе испытуемого образца, конформации различных биомолекул в живых клетках и органах, что недоступно другим методам [10].

По спектру прошедшего или отраженного импульсного излучения можно судить о составе и особенностях строения объекта, исследовать динамику протекания физических, химических и биологических процессов [11].

В данной работе с использованием методов КР и ГКР были рассмотрены образцы с различной концентрацией кортизола. По итогам проделанной работы можно сделать вывод о том, что полученный сигнал нестабилен, что делает трудным определение концентрации гормона в растворе. Из всех испытуемых примеров наличие кортизола было показано только в высоко сконцентрированных образцах (концентрация $2,76 \times 10^{-3}$ М), что значительно выше, чем физиологическое значение.

Список использованных источников

1 Абатурова, А. М. Нанобиотехнологии: практикум: учебное пособие / А. М. Абатурова, Д. В. Багров, А. А. Байжуманов, А. П. Бонарцев, А. Р. Браже. М. : Изд-во Бинوم. Лаборатория знаний, 2012. 384 с.

2 Cherkasova, O. O. Vibrational spectra of corticosteroid hormones in THz range / O. O. Cherkasova, M.N. Nazarov, D. A. Sapozhnikov // Proceeding of SPIE. 2010. Vol, № 7376. P.760.

3 Википедия [Электронный ресурс] : свободная энциклопедия / текст доступен по лицензии Creative Commons Attribution- ShareAlike; Wikimedia Foundation Inc. Некоммерческой организации Электрон дан (7112413 статей

2479181 страниц, 117 104 загруженных файлов) Wikipedia®, 2001-2018. URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Гормоны> (дата обращения: 20.05.2018) Загл. с экрана. Последнее изменение страницы 21:24 21 марта 2017 года. Яз. рус.

4 Козлов, А. И. Кортизол как маркер стресса / Козлова А. И., Козлова М. А. // Физиология человека. 2014. Т. 40. №. 2. С. 123-123.

5 Смирнова, И. И. Структурно-чувствительные изменения в спектрах терагерцового поглощения ряда кортикостероидных гормонов / И.И. Смирнова, Е. А. Федулова, М. Н. Назаров, О. О. Черкасова // Вестник НГУ. Серия Физика. 2010. Т. 5, №4. С 162–167.

6 Анисомов, Е.А. Анатомия человека / Е. В. Анисимов. СПб. : «БКК», 2017. 95 с.

7 Guifeng L. D. Qualitative and quantitative study of isomeric compounds of aminophenol by THz-TDC / L. D. Guifeng, M. A. Shihua, W. A. Wenfeng // Proc. of SPIE. 2008. Vol. № 6840. P. 684.

8 Zou, Y.J. Quantitative analysis of adhesive resin in the hybrid layer using Raman spectroscopy / Y. J. Zou, S. R. Armstrong, L.P.Jessop // Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2010. Vol. №. 1. С. 288-297.

9 Khlebtsov, B. N. Improved size-tunable synthesis and SERS properties of Au nanostars / B. N. Khlebtsov // Journal of nanoparticle research. 2014. Т. № 10. P. 2623.

10 Стецюра, И. Ю. Различные типы платформ для гигантского комбинационного рассеяния и их применение / И. Ю. Стецюра, Д. А. Горин // Известия Саратовского университета. Серия Физика. 2013. №2. С. 43-51.

11 Минаева, В. А. Спектральные особенности терагерцового поглощения и комбинационного рассеяния кортикостерона, дезоксикортикостерона, ацетата дезоксикортикостерона и ацетата кортикостерона / В. А. Минаева, О. П. Черкасова, А. В. Хмара, Г. В. Барышников, Б. Ф. Минаев // Вестник черкасского университета. Серия: Химические науки. 2014. № 14. С. 76-87.