

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

Кафедра общей и неорганической химии
наименование кафедры

**Факторы, влияющие на флуоресцентные свойства фолниевой
кислоты**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента (ки) 4 курса 411 группы

направления (специальности) 04.03.01 «Химия»

код направления подготовки (специальности)

Институт химии

наименование факультета, института, колледжа

Центра Дарьи Владимировны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель
проф. кафедры, д.х.н., проф.
должность, уч. степень, уч. звание


подпись, дата

И.Ю. Горячева
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой
д.х.н., проф.
должность, уч. степень, уч. звание


подпись, дата

Д.Г. Черкасов
инициалы, фамилия

Введение

Актуальность работы. В последнее десятилетие большой научный интерес был сфокусирован на разработке наноматериалов модифицированных фолиевой кислотой (ФК), которая обладает высокой специфичностью к взаимодействию с фолатными рецепторами клеток. Активность фолатных рецепторов на большинстве опухолевых клеток заметно выше соответствующих значений для нормальных клеток, что позволяет использовать данные материалы для нацеливания на раковые клетки. Получение таких конъюгатов является сложным многостадийным процессом, требующим дополнительной очистки. Поэтому наиболее перспективным направлением является получение флуоресцентных меток, модифицированных ФК в одну стадию, что можно осуществить гидротермальным методом синтеза.

ФК имеет низкий квантовый выход $<1\%$. В связи с этим, для применения таких наноматериалов для визуализации необходимо изучать и разрабатывать подходы, позволяющие увеличить интенсивность ее флуоресценции.

Целью данной работы является изучение факторов, влияющих на интенсивность флуоресценции фолиевой кислоты, и установление оптимальных условий для получения продуктов ФК с высокой интенсивностью флуоресценции.

Практическая значимость. Получение продуктов ФК, имеющих высокий квантовый выход флуоресценции, позволяет применять данные соединения в качестве флуоресцентных меток для локальной визуализации раковых клеток и тканей.

Научная новизна данной работы заключается в разработке подходов, позволяющих получить продукты деградации фолиевой кислоты с высокой интенсивностью флуоресценции, которые в дальнейшем могут быть использованы для непосредственной визуализации клеток или модификации наноматериалов.

Структура и объем работы. Работа включает в себя введение, 3 основные главы (17 разделов), выводы и заключение, технику безопасности и список используемых источников, состоящий из 54 наименования. Работа изложена на 51 листе, включает 5 таблиц и 41 рисунок.

Основное содержание работы

Во введении обоснована актуальность темы работы, изложена научная новизна и практическая значимость, сформулированы цель и задачи.

В первой главе представлен литературный обзор, в котором описаны факторы, влияющие на деградацию ФК, рассмотрены их достоинства и недостатки. Рассмотрены особенности строения ФК и ее оптические свойства, а также продуктов деградации ФК, описана возможность ее использование в качестве нацеливающего агента на раковые клетки. Литературный обзор также включает данные о преимуществе углеродных наночастиц (УНЧ), по сравнению с другими флуоресцентными наноматериалами, модифицированных ФК, и метод расчета квантового выхода.

Во второй главе представлено описание используемого оборудования и реагентов, описаны методы исследования. Представлены методики приготовления раствора ФК при различном значении pH, воздействия УФ-света на раствор ФК, гидротермальной обработки, проведения электрофореза

В третьей главе представлено описание результатов экспериментов, полученных в ходе работы.

Для выбора оптимальной концентрации ФК использовались водные растворы с концентрацией 10^{-3} и 10^{-4} М, которые облучались УФ-светом различное время.

При воздействии на раствор ФК $C=10^{-3}$ М происходит увеличение оптической плотности при 280 нм (максимум характерный для ПАБК-Глу) происходит после 20 мин. облучения, а при 350 нм (характерный для птерина и его производных) после 60 мин. (рисунок 1А). Спектры поглощения образцов с временем облучения в течении 90 и 150 мин. одинаковы, что говорит об окончании фотодеградации ФК. Сдвиги полос поглощения не наблюдаются.

При увеличении времени воздействия УФ на раствор ФК происходит рост интенсивности ФЛ (рисунок 1Б). Максимальная интенсивность ФЛ

наблюдается при самом длительном (150 мин.) воздействии УФ-света, КВ ФЛ составляет 16%.

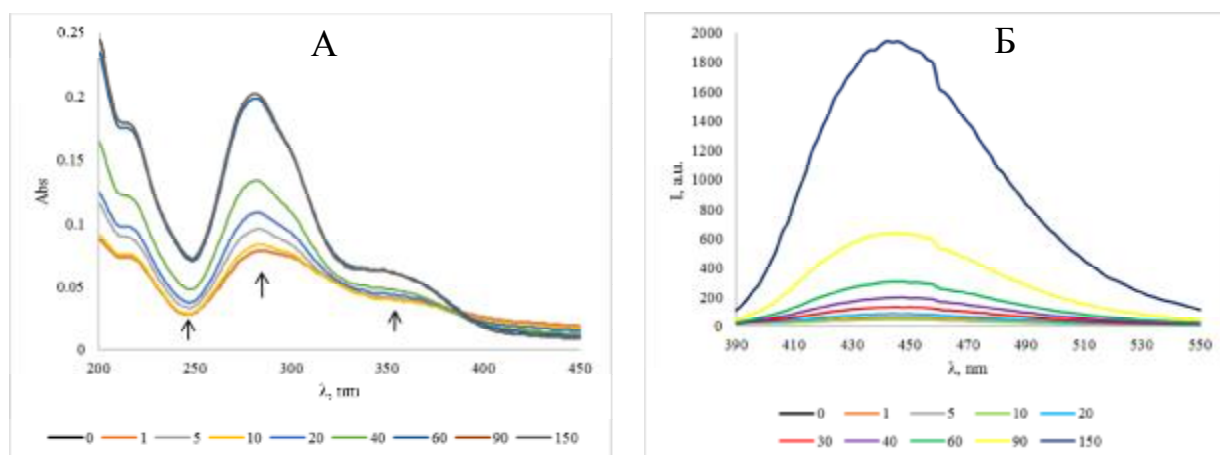


Рисунок 1 – Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) ($\lambda_{ex}=350\text{nm}$) растворов ФК ($C=10^{-3}\text{M}$), облученных УФ-светом различное время (в минутах)

При понижении концентрации ФК наблюдаются более сильные изменения в спектрах поглощения после воздействия УФ (рисунок 2А). Оптическая плотность в коротковолновой области ($<260\text{ nm}$) увеличивается, тогда как пик поглощения при 280 нм сначала увеличивается, а после 90 мин. уменьшается и сдвигается в коротковолновую область спектра (рисунок 21). Пик при 350 нм смещается в сторону более длинных волн после 20 мин. воздействия УФ, а через 40 мин сдвигается на более короткие волны, что указывает на то, что фотодеградация ФК является двухстадийным процессом и что образуется промежуточный фотопродукт Фпт, который в дальнейшем окисляется до Кпт.

При увеличении времени облучения раствора ФК увеличивается интенсивность ФЛ (рисунок 2Б). После 20 мин. воздействия УФ наблюдается резкое увеличение интенсивности ФЛ и после 60 мин. изменения незначительны. КВ ФЛ после 50 мин. облучения не изменяется (в пределах погрешности) и равен $30\pm 1\%$, что практически в 2 раза больше, чем у раствора ФК с $C=10^{-3}\text{ M}$. Предположительно, это связано с наличием крупных не растворившихся кристаллов ФК при $C=10^{-3}\text{ M}$. Из полученных данных видно, что оптимальной концентрацией ФК является 10^{-4} M .

Под действием внешнего электрического поля ФК разделяется на 2 отрицательно заряженных пятна с близкой яркостью свечения (рисунок 3).

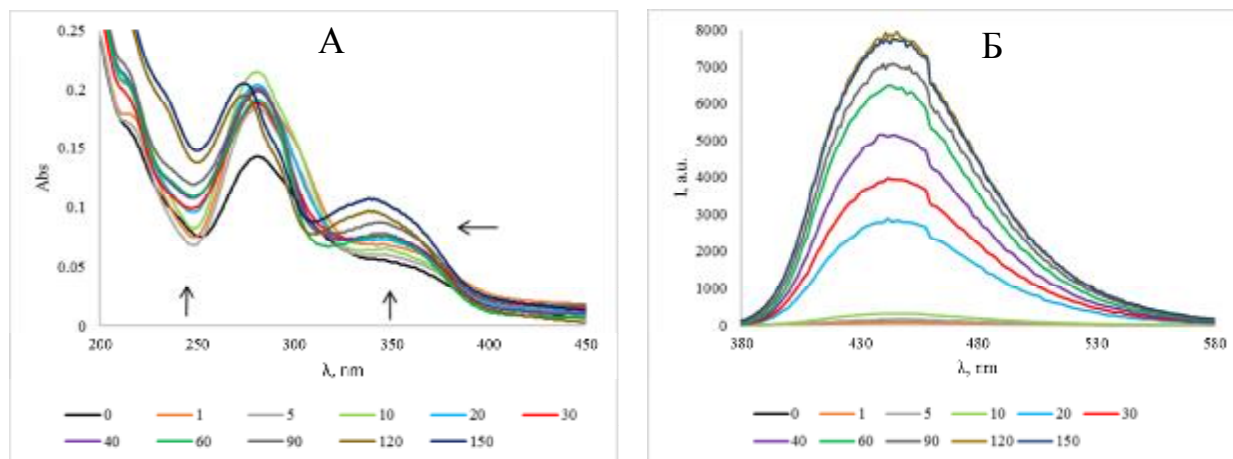


Рисунок 2 – Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) ($\lambda_{ex}=350\text{nm}$) растворов ФК ($C=10^{-4}\text{M}$), облученных УФ-светом различное время (в минутах)



Рисунок 3 – Электрофореграмма растворов ФК при различном времени (в минутах) облучения УФ-светом в УФ-лампе

Процессы протонирования/депротонирования ФК сопровождаются изменениями в оптических свойствах, наибольшее влияние на которые оказывает птериновый фрагмент.

В сильно кислой среде максимум при 350 нм отсутствует, а более коротковолновый сдвигается в длинноволновую область. При рН 5.5 и 7.5 спектры поглощения отличаются не значительно, а при рН 11 появляется дополнительный максимум при 260 нм, а для длинноволнового максимума наблюдается батохромный сдвиг (рисунок 4 (1а)).

ФК в сильнокислом и сильнощелочном растворах обладает низкой интенсивностью ФЛ, со сдвигом максимума в длинноволновую область (рисунок 4 (1б)). При низких значениях рН происходит дезактивация

птеринового фрагмента ФК протонами, а при высоких идёт тушение гидроксид-ионами.

Из спектров поглощения, полученных после 1 часа воздействия УФ-света на растворы ФК в различных средах (рисунок 4 (2а)), можно сделать вывод, что процесс фотодеградации ФК различается в зависимости от значения рН. Для рН 5.5 наблюдается максимальная интенсивность ФЛ до и после воздействия УФ, поэтому наиболее подходящей средой является слабокислая при рН=5,5 в водном растворе.

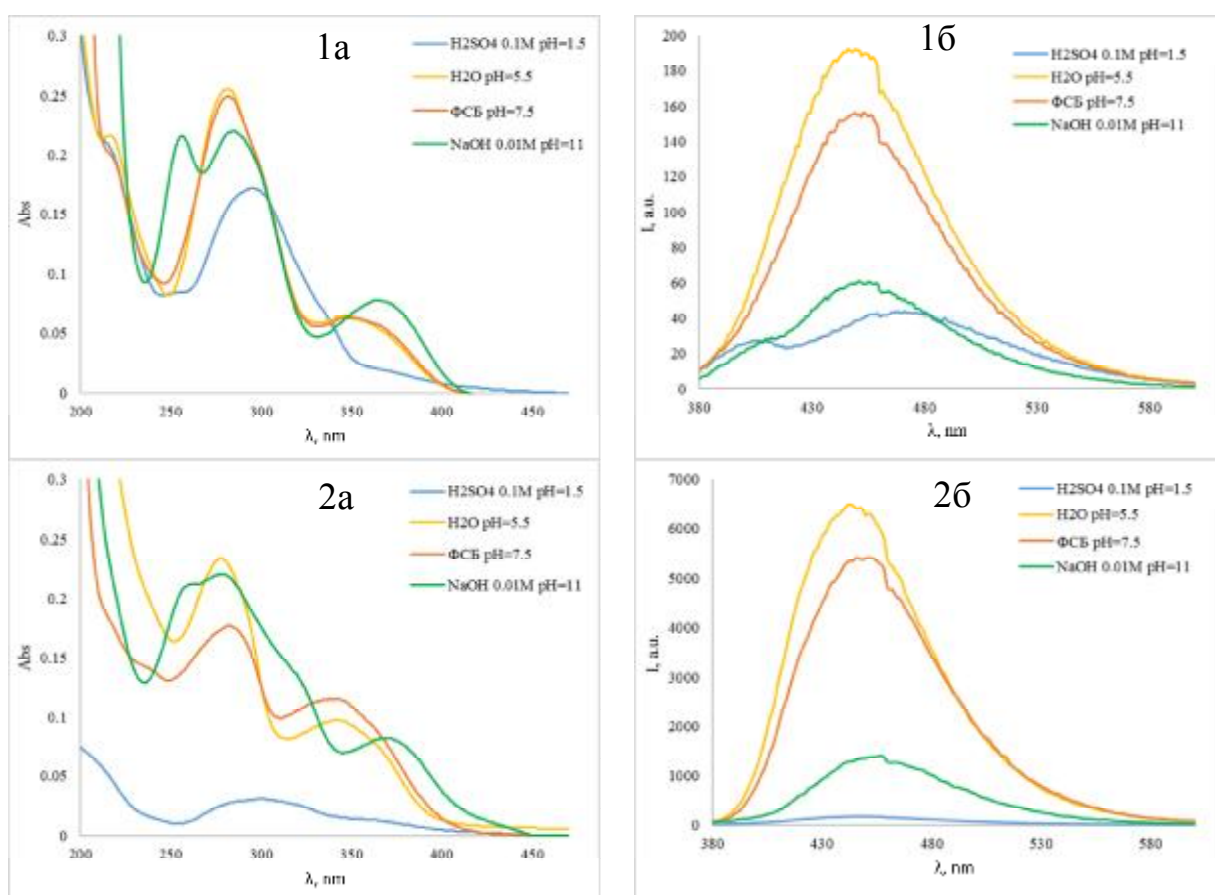


Рисунок 4 – Спектры поглощения (а) и флуоресценции (б) ($\lambda_{ex}=350\text{nm}$) растворов ФК при различных рН до (1) и после (2) облучения УФ-светом

Чтобы определить температуру, необходимую для разрушения ФК, и характер ее влияния на деградацию, была проведена гидротермальная обработка при различной температуре.

С увеличением температуры автоклавирования увеличивается оптическая плотность растворов. При температуре 180 и 200 °С полосы поглощения накладываются друг на друга и отличаются только в коротковолновой области

(<250 нм), при 220, 240 и 260 °С отличаются незначительно оптическая плотность увеличивается для обоих максимумов 280 и 350 нм (рисунок 4А). Сдвигов полос поглощения не наблюдается.

Интенсивность ФЛ увеличивается с повышением температуры автоклавирования (рисунок 4Б), но КВ после 200 °С не изменяется и равен 2 %. Поэтому оптимальная температура для гидротермальной обработки 200 °С в течении одного часа.

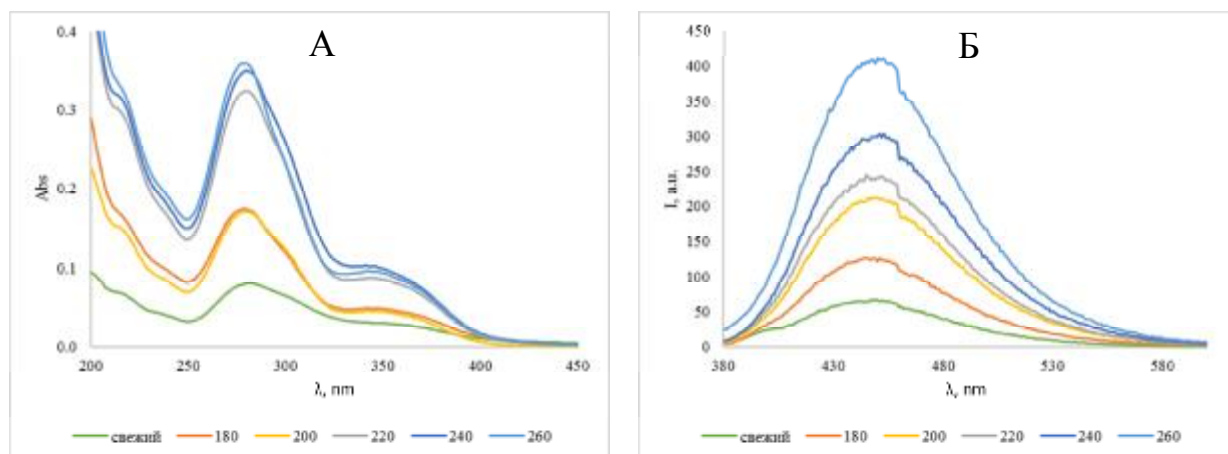


Рисунок 4 – Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) ($\lambda_{ex}=350\text{nm}$) автоклавированных растворов ФК при различной температуре (в °С)

Для оценки возможности использования полученных продуктов фотодеградации ФК в качестве модифицирующего агента, была проведена гидротермальная обработка облученного раствора.

Введены следующие сокращения для растворов ФК: «УФ» - облученный УФ-светом, «УФ-Т» - автоклавированный облученный, «УФ-Т-УФ» - облученный раствор УФ-Т.

После автоклавирования облученного раствора ФК при 200°С в течении 1 часа происходит увеличение оптической плотности при 280 нм, а после 1 часа воздействия УФ понижение, при этом в длинноволновом максимуме оптическая плотность не изменяется (рисунок 5А).

Раствор ФК «УФ-Т» и «УФ-Т-УФ» имеют одинаковую интенсивность ФЛ, не значительно отличающуюся от «УФ» (~700 отн.ед.) (рисунок 5Б). КВ при этом сохраняется и равен 34 %.

Под действием внешнего электрического поля ФК «УФ-Т» и «УФ-Т-УФ» разделяется на два отрицательно заряженных пятна с близкой яркостью свечения, аналогично облученному раствору ФК (рисунок 6).

Из полученных данных можно сделать вывод, что облучение автоклавированного раствора ФК не приводит к увеличению интенсивности ФЛ и птериновый фрагмент ФК сохраняется после гидротермальной обработки в течение 1 часа при 200°C.

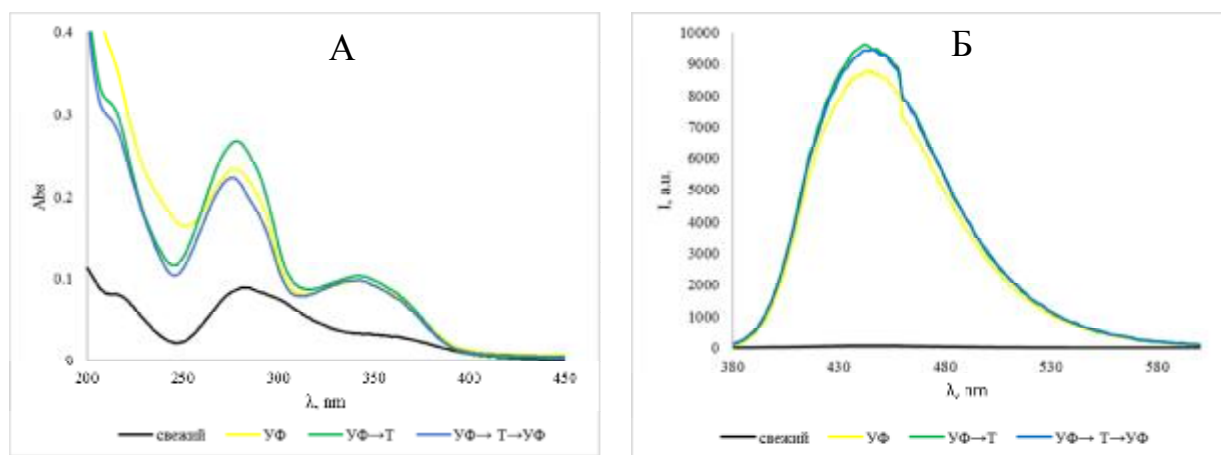


Рисунок 5 – Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) ($\lambda_{ex}=350\text{nm}$) растворов ФК



Рисунок 6 – Электрофореграмма различных образцов ФК в УФ-лампе

Выводы и заключение

На основании полученных данных можно сделать выводы:

1. Изучены факторы, влияющие на оптические свойства фолиевой кислоты: рН, концентрация, облучение, гидротермальная обработка. Показано, что в более концентрированных растворах деградация ФК проходит значительно медленнее, процесс фотодеградации ФК различается в зависимости от рН. Подходящей средой является слабо кислая при рН=5.5;

2. В результате гидротермальной обработки, облученной ФК не происходит значительных изменений в спектрах флуоресценции и поглощения. При температуре гидротермальной обработки выше 200°C не происходит увеличения квантового выхода флуоресценции, в связи с этим оптимальной температурой была выбрана 200°C для сохранения птеринового фрагмента ФК.


Таким образом, нами были изучены факторы, влияющие на деградацию фолиевой кислоты, позволяющие увеличить интенсивность флуоресценции. Воздействие ультрафиолетового света на фолиевую кислоту приводит к образованию высоко флуоресцентных продуктов фотолиза: 6-формилптерина и 6-карбоксихптерина, которые сохраняют свои оптические свойства после гидротермальной обработки. Это позволяет в дальнейшем использовать полученные продукты для непосредственной визуализации клеток или модификации наноматериалов.

Список используемых источников

- 1 Dántola, M. L. Effect of pterin impurities on the fluorescence and photochemistry of commercial folic acid / M. L. Dántola, M. N. Urrutia, A. H. Thomas // *J. Photochem. Photobiol.* – 2018. – Vol. 181. – P. 157–163.
- 2 Blakley, R.L. Folates and pterins / R.L. Blakley, S. J. Benkovic // *John Wiley & Sons.* – 1984. – Vol. 1. – P. 630.
- 3 Chen, C. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors / C. Chen, J. Ke, X.E. Zhou, W. Yi, J.S. Brunzelle, J. Li, E.L. Yong, H.E. Xu // *Nature.* – 2013. – Vol. 500, № 7463. – P. 486–489.
- 4 Thomas, A.H. Fluorescence of pterin , 6-formylpterin , 6-carboxypterin and folic acid in aqueous solution: pH effects / A.H. Thomas, C. Lorente, A.L. Capparelli, R. Pokhrel, A.M. Braun, E. Oliveros // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – Vol. 1. – P. 421–426.
- 5 Gazzali, A.M. Stability of folic acid under several parameters / A.M. Gazzali, M. Lobry, C. Frochot, et al. // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2016. – Vol. 93. – P. 419–430.
- 6 Akhtar, M.J. Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution / M.J. Akhtar, M.A. Khan, I. Ahmad // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2003. – Vol. 31. – P. 579–588.
- 7 Vora, A. Thermal stability of folic acid / A. Vora, A. Riga, et al. // *Thermochim. Acta.* – 2002. – Vol. 392. – P. 209–220.
- 8 Day, B.P.F. Thermal Stability of Folic Acid and 5-Methyltetrahydrofolic Acid in Liquid Model Food Systems / B.P.F. Day, J.F. Gregory // *J. Food Sci.* – 1983. – Vol. 48, № 2. – P. 581–587.
- 9 Song, Y. Fluorescent carbon nanodots conjugated with folic acid for distinguishing folate-receptor-positive cancer cells from normal cells / Y. Song, W. Shi, W. Chen, X. Li // *J. Mater. Chem.* – 2012. – Vol. 22, № 25. – P. 12568–12573.
- 10 Bhunia, S.K. Carbon Nanoparticle-based Fluorescent Bioimaging Probes / S.K. Bhunia, A. Saha, A.R. Maity, C. Ray Sekhar, R.J. Nikhil // *Sci. Rep.* – 2013. – Vol. 3. – P. 1.

Список используемых источников

- 1 Dántola, M. L. Effect of pterin impurities on the fluorescence and photochemistry of commercial folic acid / M. L. Dántola, M. N. Urrutia, A. H. Thomas // *J. Photochem. Photobiol.* – 2018. – Vol. 181. – P. 157–163.
- 2 Blakley, R.L. Folates and pterins / R.L. Blakley, S. J. Benkovic // John Wiley & Sons. – 1984. – Vol. 1. – P. 630.
- 3 Chen, C. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors / C. Chen, J. Ke, X.E. Zhou, W. Yi, J.S. Brunzelle, J. Li, E.L. Yong, H.F. Xu // *Nature.* – 2013. – Vol. 500, № 7463. – P. 486–489.
- 4 Thomas, A.H. Fluorescence of pterin , 6-formylpterin , 6-carboxypterin and folic acid in aqueous solution: pH effects / A.H. Thomas, C. Lorente, A.L. Capparelli, R. Pokhrel, A.M. Braun, E. Oliveros // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2002. – Vol. 1. – P. 421–426.
- 5 Gazzali, A.M. Stability of folic acid under several parameters / A.M. Gazzali, M. Lobry, C. Frochet, et al. // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2016. – Vol. 93. – P. 419–430.
- 6 Akhtar, M.J. Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution / M.J. Akhtar, M.A. Khan, I. Ahmad // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2003. – Vol. 31. – P. 579–588.
- 7 Vora, A. Thermal stability of folic acid / A. Vora, A. Riga, et al. // *Thermochim. Acta.* – 2002. – Vol. 392. – P. 209–220.
- 8 Day, B.P.F. Thermal Stability of Folic Acid and 5-Methyltetrahydrofolic Acid in Liquid Model Food Systems / B.P.F. Day, J.F. Gregory // *J. Food Sci.* – 1983. – Vol. 48, № 2. – P. 581–587.
- 9 Song, Y. Fluorescent carbon nanodots conjugated with folic acid for distinguishing folate-receptor-positive cancer cells from normal cells / Y. Song, W. Shi, W. Chen, X. Li // *J. Mater. Chem.* – 2012. – Vol. 22, № 25. – P. 12568–12573.
- 10 Bhunia, S.K. Carbon Nanoparticle-based Fluorescent Bioimaging Probes / S.K. Bhunia, A. Saha, A.R. Maity, C. Ray Sekhar, R.J. Nikhil // *Sci. Rep.* – 2013. – Vol. 3. – P. 1.

 21.06.2019