

Введение

Актуальность работы. В настоящее время являются актуальными методы, основанные на использовании наночастиц (НЧ). Среди них наибольший интерес привлекли НЧ из благородных металлов (Au) связи с их оптическими и каталитическими свойствами.

Интерес к НЧ золота (ЗНЧ) обуславливается их перестраиваемыми оптическими свойствами, которые могут применяться во многих областях для обнаружения, визуализации и мониторинга в качестве контрастирующего агента или носителя для направленной доставки. Уникальные оптические свойства коллоидного золота возникают из-за ограниченного размера. Особенностью ЗНЧ является яркий цвет раствора, вызванный поверхностно-плазмонным резонансом (ППР). В последнее время многие исследователи изучают ЗНЧ с разным размером и формой.

Известны разные способы получения ЗНЧ с варьируемыми размером и формой. Золотые наночастицы с модифицированной поверхностью прекрасно подходят для фототермической терапии, доставки лекарств и диагностики.

Методы исследования. Регистрацию спектров пропускания растворов проводили на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800. Измерения спектров испускания растворов проводили на спектрофотометре Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, который предназначен для измерения и регистрации спектров испускания и возбуждения флуоресценции веществ в области спектра 220-820 нм.

Измерение размера наночастиц осуществляли методом динамического светорассеяния на анализаторе размера частиц Malvern Zetasizer Nano. Также данный прибор позволяет характеризовать электрокинетический потенциал наночастиц методом электрофореза.

Размер и форму частиц регистрировали с использованием сканирующего электронного микроскопа MIRA II LMU и просвечивающего электронного микроскопа JEOL 2010.

Наличие функциональных групп в полученных образцах регистрировали на ИК-спектрометре Nicolet 6700 и спектрокопе комбинационного рассеивания Renishaw inVia.

Практическая значимость. Практическая значимость исследования заключается в возможности использования его результатов в иммуноанализе.

Цели и задачи исследования. Целью работы являлась модификация ЗНЧ фолиевой кислотой (ФК) с помощью гидротермального синтеза и последующее применение полученных наночастиц в иммуноанализе.

Научная новизна. Состоит в:

1. оптимизации методик функционализации поверхности полученных ЗНЧ;
2. проведении исследований влияния фотодеградациии фолиевой кислоты на функционализацию ЗНЧ.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, методик синтеза и функционализации ЗНЧ, изложения результатов и их обсуждения (3 главы), выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 66 ссылок. Работа изложена на 52 страницах, содержит 18 рисунков и 6 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность проведенных исследований, сформулирована их основная цель, описаны научная новизна и практическая значимость.

В **главе 1** представлен обзор литературы, в котором описаны способы получения ЗНЧ. Рассмотрены методы синтеза ЗНЧ с использованием различных растворителей и восстановителей. Были подробно описаны способы функционализации поверхности ЗНЧ. Представлена общая информация по применению ЗНЧ в медицине, биосенсорике и иммуноанализе. Так же была отдельно рассмотрена фолиевая кислота, как лиганд на поверхности ЗНЧ, который может взаимодействовать с рецепторами на раковых клетках.

Во главе 2 представлено описание используемого оборудования и реагентов, используемых для проведения синтеза ЗНЧ и их функционализации. Представлен реагенты которые необходимы для приготовления растворов ФК и антител. Описаны методы исследования, которые применяли для изучения свойств функционализированных ЗНЧ. Описаны методики синтеза функционализированных ЗНЧ с использованием ультрафиолетового света. По методикам, разработанным ранее были получены сферические ЗНЧ. В качестве стабилизатора использовали цитрат натрия. Для повышения стабильности, увеличения фотолюминесценции (ФЛ) и добавления функциональных групп на поверхность ЗНЧ проводили функционализацию ФК с помощью гидротермального синтеза.

Последующую очистку полученных ЗНЧ проводили с помощью центрифугирования и эксклюзионной хроматографии. Данные методы позволили определить произошло ли связывание между фолатными группами и поверхностью ЗНЧ. Стабильность функционализированных НЧ была определена с помощью методики определения золотого числа.

Глава 3 посвящена изучению оптических и физических свойств функционализированных ЗНЧ и их применению в иммуноанализе.

С помощью методики одностадийной функционализации ЗНЧ фолиевой кислотой было выбрано оптимальное объемное соотношение реагентов (1:1). Для данного образца были исследованы оптические характеристики с помощью спектров поглощения и ФЛ (рис. 1 и 2).

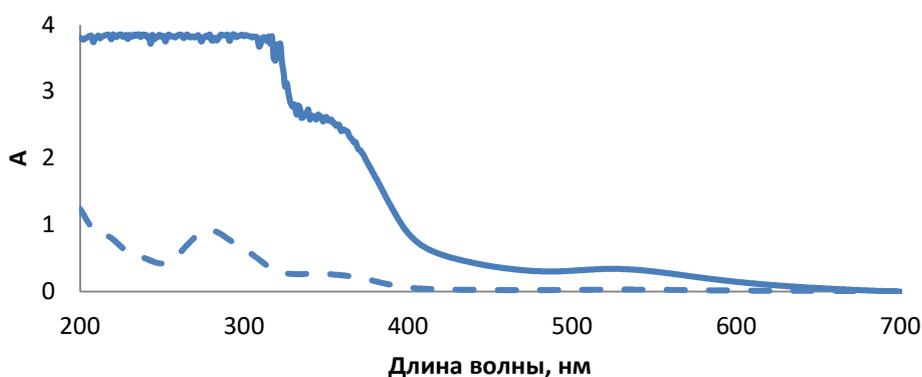


Рисунок 1 - Спектры поглощения раствора ФК-ЗНЧ объемном соотношении 1:1 после гидротермального синтеза (сплошная линия – концентрированный образец; штриховая линия – образец, разбавленный в 10 раз)

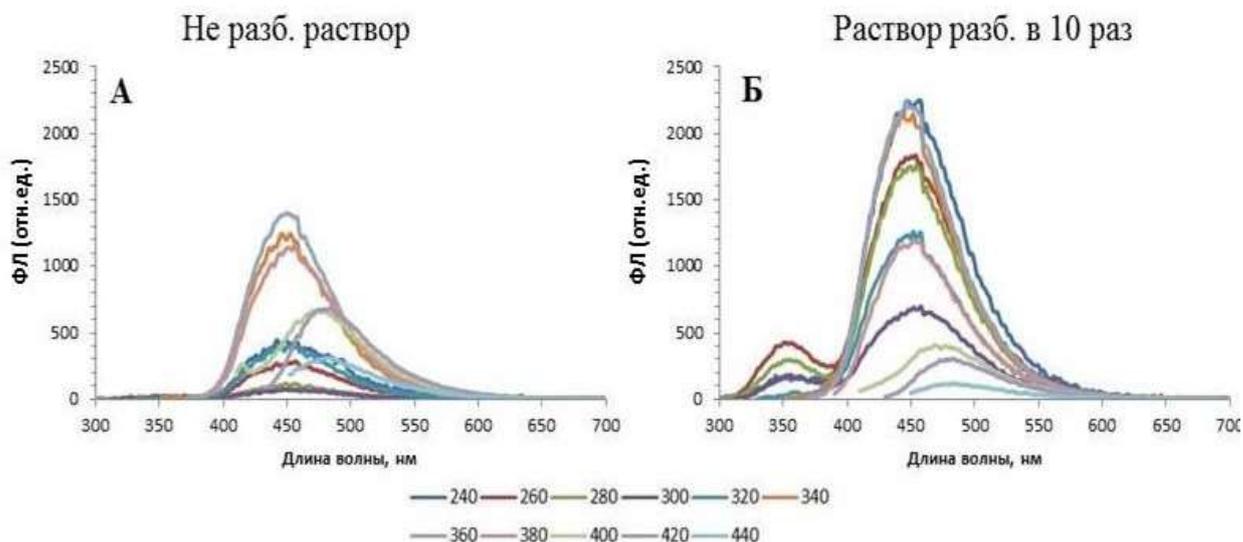


Рисунок 2 - Спектры ФЛ образца ЗНЧ-ФК после гидротермального синтеза

Исходя из спектров видно, что интенсивность ФЛ образца увеличивается после разбавления в 10 раз, что говорит о концентрационных эффектах, так как растворимость ФК в воде ниже, чем используемая нами концентрация $C = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Так же для установления наличия функциональных групп на поверхности функционализированных ЗНЧ были сняты ИК-спектры и спектры комбинационного рассеяния (КР) (рис. 3).

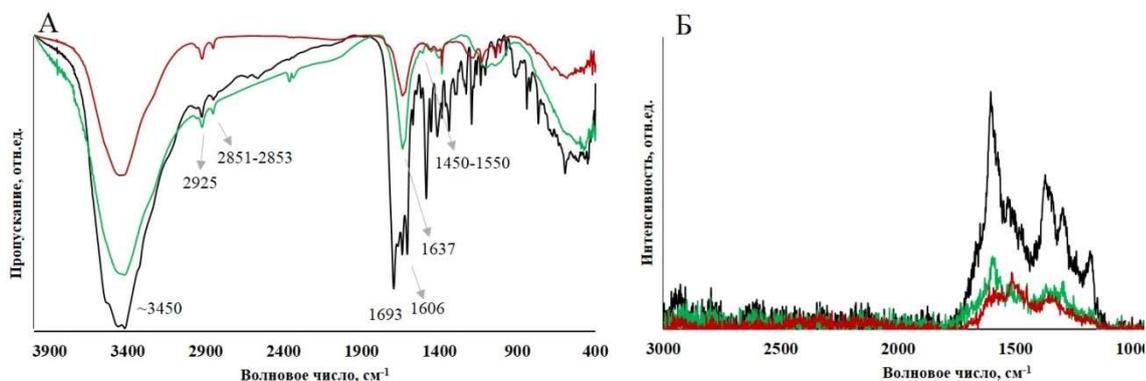


Рисунок 3 - Спектры ИК (А) и КР (Б) для ФК (черный), ФК (зелёный) и ФК-ЗНЧ (красный).

Спектры инфракрасной спектроскопии (ИК) (рис. 3 (А)) показывают, что никаких существенных изменений в молекулярной структуре в результате гидротермального синтеза ФК не происходит, что подтверждается спектрами поглощения. Единственными признаками являются два относительно слабых, но заметных острых пика, появляющихся в диапазоне 1400-1550 см⁻¹ (обозначены стрелкой на рис. 8(А)), которые, скорее всего, связаны с ароматическими связями С=С группы. Уменьшение интенсивности полосы около 3450 см⁻¹ может указывать на уменьшение групп, связанных с водородом (-ОН и -СН), и согласуется с увеличением интенсивности ФЛ, т.к. эти группы находятся во фрагменте ПАБК, которая в свою очередь отвечает за тушение ФЛ.

Изменение спектров комбинационного рассеивания (КР) (рис. 3 (Б)) является более показательными. В результате гидротермальной обработки наблюдаются изменения всех основных функций. Наиболее заметным является значительное снижение сигнала О-Н, С-Н и СН₂-групп. Последнее, в частности, может присутствовать только в ПАБК.

Относительный квантовый выход для образца ЗНЧ-ФК составил 1%, для ФК после гидротермального синтеза – 1,5%.

Для того, чтобы увеличить эти показатели было решено проводить обработку ФК ультрафиолетовым (УФ) светом перед гидротермальным синтезом, т.к. из литературных данных известно о фотодеградации ФК.

Для всех образцов был рассчитан квантовый выход относительно хинин сульфата. В таблице 1 представлены значения квантового выхода для различных образцов.

Таблица 4 – Значения квантового выхода полученных образцов

Образец	Квантовый выход, %			
	0 мин	60 мин	120 мин	180 мин
1. ЗНЧ:ФК $1 \cdot 10^{-12} : 5 \cdot 10^{-4}$ М	0,5	2	2	3
2. ЗНЧ:ФК $2 \cdot 10^{-12} : 10^{-3}$ М	0,3	5	1,5	4
3. ЗНЧ $2 \cdot 10^{-12}$ М	0,06	0,08	0,7	0,06
4. ЗНЧ $1 \cdot 10^{-12}$ М	0,05	0,02	0,003	0,04
5. ФК $5 \cdot 10^{-4}$ М	0,4	9	9,5	9
6. ФК $1 \cdot 10^{-3}$ М	0,3	8,5	10	6
7. ЗНЧ:(ФК УФ) $1 \cdot 10^{-12} : 5 \cdot 10^{-4}$ М	12	13	6,5	9

8. (ЗНЧ:ФК) УФ $1 \cdot 10^{-12} : 5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$	16	18	11	18
9. ФК УФ $1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$	17	19	18	6
10. ФК УФ $5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$	9	17	14	15
11. ЗНЧ УФ $C=2 \cdot 10^{-12} \text{ М}$	0,02	3	0,1	-

У образцов 3, 4, 5, 6 наблюдается минимум квантового выхода на 120 минутах гидротермального синтеза, затем квантовый выход снова возрастает. У образцов, облученных УФ значения квантового выхода значительно выше и мало изменяются от времени гидротермального синтеза. У образцов, не облученных УФ квантовый выход увеличивается после гидротермального синтеза, у образца 2 – линейно зависит от времени, у образца 3 – минимум на 120 минутах.

Наибольшая интенсивность ФЛ наблюдается в основном при $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ нм}$. У образцов 1 и 2 наибольшая интенсивность ФЛ при 120 минутах гидротермального синтеза. У образцов 3, 4, 5 и 6 наблюдается уменьшение интенсивности ФЛ и обработке 120 минут, затем ФЛ снова увеличивается (так же как и КВ).

Образцы с наибольшим значением квантового выхода были взяты для проведения иммуноанализа с использованием моноклональных антител к ФК (clon 1 FA) в концентрации 0,01 мг/мл. В качестве контроля неспецифического связывания использовали БСА $C=1\%$.

На рисунке 4 приведены спектры поглощения и ФЛ образцов до промывки ФСБ.

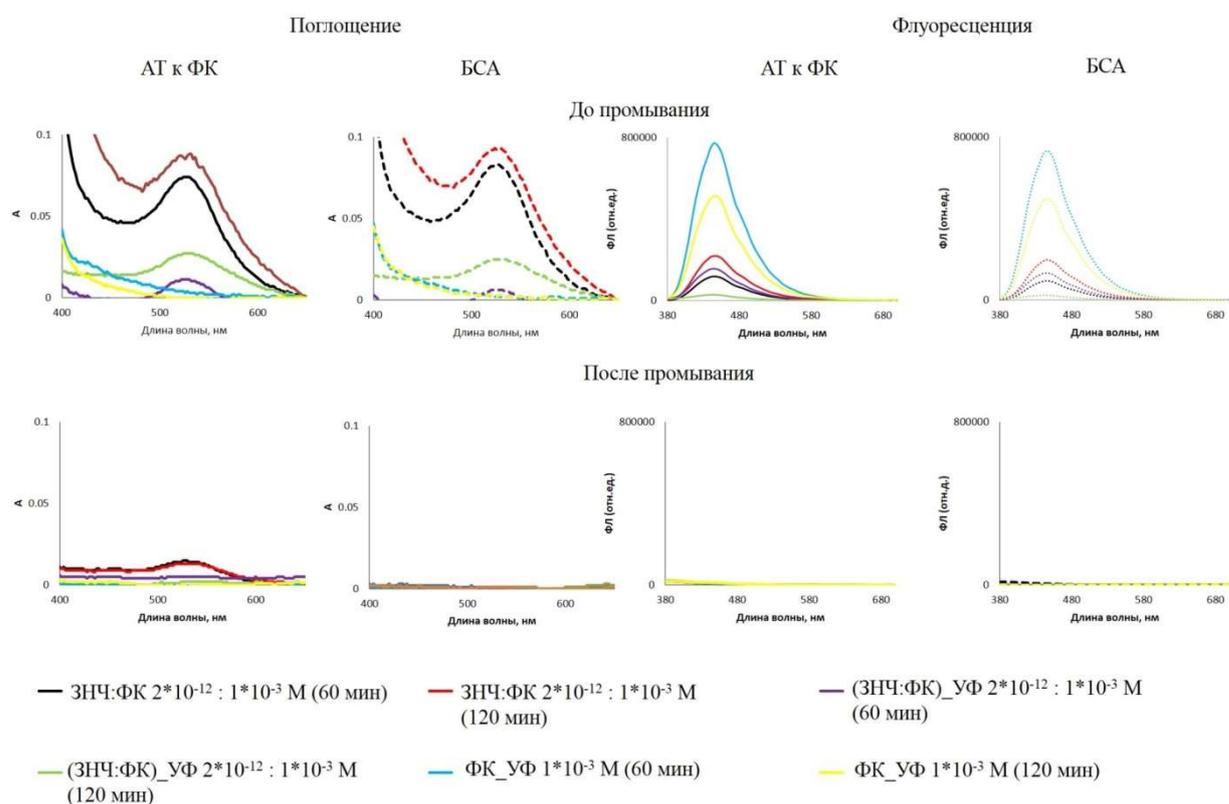


Рисунок 4 - Спектры поглощения и ФЛ (длина волны возбуждения 350 нм).

После промывки ФСБ на моноклональных АТ остаются характеристичные полосы поглощения ППР ЗНЧ для образцов ЗНЧ:ФК $2 \cdot 10^{-12} : 1 \cdot 10^{-3}$ M после 60 и 120 минут гидротермального синтез, образцы, облученные УФ не связываются с АТ. Так же образцы не связываются с БСА, что говорит об отсутствии неспецифичного связывания и возможно предположить об изменении в структуре птеринового фрагмента.

Заключение

Изучены подходы к функционализации золотых наночастиц фолиевой кислотой с помощью гидротермального метода. Установлено, что в оптимальных условиях удается провести одностадийную модификацию с получением стабильного коллоида ЗНЧ, покрытого тонким слоем фолатов с сохранением их функциональности.

Для увеличения квантового выхода люминесценции полученных структур с помощью фолиевой кислоты проведено предварительное облучение фолатов УФ. В оптимизированных условиях удается повысить КВ ФК до 19 %. В результате гидротермальной обработке ЗНЧ в присутствии облученной ФК получены структуры с КВ = 18 %

Полученные функционализированные ЗНЧ специфически связываются с моноклональными АТ к фолиевой кислоте, что позволяет использовать их в иммуноанализе.