

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

Кафедра биохимии и биофизики

ФОТОМОДИФИКАЦИЯ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы


Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Симоненко Андрея Викторовича

Научный руководитель:

к.б.н., доцент


подпись, дата

М.В. Каневский

Научный консультант:


к.ф.-м.н., с.н.с.


подпись, дата

В.А. Ханадеев

Зав. кафедрой:

д.б.н, проф.


подпись, дата
10.06.2021 г.

С.А. Коннова

Саратов 2021

Введение. Золото является одним из самых первых металлов, который открыл человек. История его изучения и применения насчитывает несколько тысяч лет. Еще в древние времена коллоидное золото использовали в медицинских целях. В современном мире золотые наночастицы активно используются в биомедицинских приложениях, таких как диагностика, профилактика и даже терапия. Такой широкий спектр обусловлен их физическими и химическими свойствами. Золото является инертным металлом, который биосовместим и имеет поверхность, которую можно модифицировать. Основным свойством золотых наночастиц является их поверхностный плазмонный резонанс, который можно настраивать на определенную длину волны, изменяя форму и размеры. Однако высокая мощность лазерного воздействия при использовании наночастиц может привести к фотомодификации – изменению формы и размера под действием лазерного излучения. В результате этого будет снижена эффективность использования золотых частиц. Таким образом, существует необходимость в определении порогов повреждения наночастиц под действием лазерного излучения.

Целью данной работы было исследовать фотомодификацию золотых наностержней без оболочки и с оболочкой из диоксида кремния под действием наносекундного импульсного лазера, а также исследовать цитотоксичность наностержней для последующего потенциального использования в биомедицинских приложениях.

Для достижения поставленных целей работы нужно было решить следующие задачи:

- 1) Проанализировать литературные данные по фотомодификации золотых наночастиц.
- 2) Синтезировать золотые наностержни с плазмонным резонансом, настроенным на длину волны из «окна прозрачности» биоткани.
- 3) Покрывать полученные образцы золотых наностержней оболочкой из диоксида кремния контролируемой толщины.

4) Исследовать фотомодификацию исходных наночастиц и покрытых оболочкой из диоксида кремния под действием импульсного лазерного облучения.

5) Исследовать цитотоксичность синтезированных наночастиц на клеточных линиях *in vitro* с использованием теста на восстановление резазурина.

Исследование выполнялось с использованием современных методов. На основе двух поверхностно-активных веществ: ЦТАБ и олеата натрия (NaOl) были получены золотые наностержни. Далее на этих частицах синтезировали оболочку из диоксида кремния с использованием тетроэтилортосиликата. Для фотомодификации использовали перестраиваемый наносекундный лазер Ekspla NT 200 (Ekspla, Литва). Спектры экстинкции регистрировали с помощью спектрофотометра Specord S300 (Analytik Jena, Германия). Изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) получали с помощью микроскопа Libra-120(Carl Zeiss, Германия) в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН. С помощью спектрофлуориметрического метода на основе реагента аламарового синего проводили тест на токсичность золотых наностержней на двух линиях клеток: С6 глиоме и фибробластах кожи крысы

Бакалаврская работа состоит из введения, 3 глав основной части (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы написан на основе анализа 38 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: характеристика видов золотых наночастиц: наносферы, наностержни, нанооболочки, нанозвезды; биомедицинские применения золотых наночастиц с использованием лазерного излучения: доставка лекарств, оптопорация, фотоакустическая визуализация, фототермическая и фотодинамическая терапии; исследования фотомодификации золотых наночастиц: наносфер, наностержней, нанооболочек и нанозвезд.

Основное содержание работы. В результате синтеза с использованием двух поверхностно-активных веществ: ЦТАБ и олеата натрия (NaOl) были

получены золотые наностержни со средней длиной $83,2 \pm 6,2$ нм и с шириной $18,9 \pm 1,3$ нм. Длинноволновый плазмонный резонанс был настроен на 900 нм. Также были получены образцы наностержней с оболочкой из диоксида кремния толщиной $23,8 \pm 2,92$; $30,48 \pm 3,03$ и $57,26 \pm 6,4$ нм. С помощью просвечивающей электронной микроскопии было обнаружено, что при минимальной толщине оболочки она имеет неровный контур, однако с увеличением толщины она приближается к сферической форме. Анализ спектров экстинкции показал, что при нанесении оболочки из диоксида кремния происходит сдвиг плазмонного резонанса в области ближнего инфракрасного излучения. Это связано с изменением локального диэлектрического окружения наностержней. При самой тонкой оболочке резонанс сдвинулся на 10 нм. При толщине оболочки $30,48 \pm 3,03$ нм основной пик смещается примерно на 20 нм, а при самой толстой оболочке ПР смещается до 935 нм. Также можно наблюдать увеличение интенсивности в области коротких длин волн, которое связано с образованием большого числа частиц из диоксида кремния в исследуемом образце.

Для фотомодификации были выбрана схема, в которой частицы двигались под давлением по капилляру. Во-первых, такая схема является имитацией движения наночастиц в кровотоке. Во-вторых, движение наночастиц по капилляру предполагает однократное облучение всего объема коллоида. Сначала мы провели фотомодификацию золотых наностержней без оболочки с разной скоростью движения от 15 до 0,94 мм/с. После облучения импульсным лазером при скорости движения 15 мм/с в образце можно наблюдать 3 фракции наночастиц: исходные наностержни, Ф-частицы – переходная форма между стержнем и шариком, наносферы. С уменьшением скорости движения происходит снижение доли исходных наностержней и Ф-частиц, а доля золотых наносфер увеличивается. Такая зависимость объясняется тем, что при снижении скорости частицы могут облучаться несколько раз, полностью трансформируясь в наносферы. С помощью спектров экстинкции было показано, что с уменьшением скорости движения наностержней в капилляре происходит снижение высоты основного пика

плазмонного резонанса на 900 нм и увеличение амплитуды коротковолнового пика ПР на 530 нм, который соответствует плазмонному резонансу наносфер. Такие изменения согласуются с тем, что происходит трансформация наностержней в наносферы.

Для исследования влияния оболочки из диоксида на фотостабильность золотых наностержней мы сначала определили порог фотомодификации частиц без оболочки, потом с оболочкой, а затем сравнили их между собой. Наночастицы облучали импульсным лазером с энергией от 1 до 370 мкДж. С помощью метода электронной микроскопии и спектроскопии экстинкции было обнаружено, что для наностержней без оболочки старт фотомодификации начинается с энергии лазерного импульса 3 мкДж. В образце большую часть составляют золотые наностержни, однако уже появляются фракции Ф-частиц и наносфер. При этом длинноволновый плазмонный резонанс на 900 нм постепенно снижается и происходит его уширение, а амплитуда ПР растёт около 530 нм, что соответствует плазмонному резонансу наносфер. При увеличении энергии до 40 мкДж происходит уменьшение доли исходных наностержней и увеличение доли наносфер. В случае с энергией импульса 160 мкДж практически все наночастицы модифицируются в сферы, и даже наблюдается фрагментация. Спектр экстинкции типичный для наносфер с пиком ПР на 530 нм.

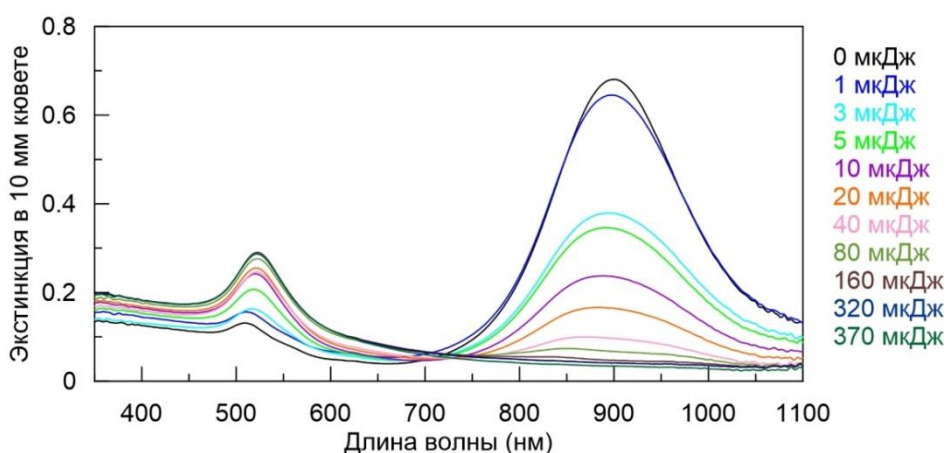


Рисунок 1– Спектр экстинкции золотых наностержней до и после фотомодификации импульсным лазером с энергией от 1 до 370 мкДж

Фотомодификацию наностержней с оболочкой из диоксида кремния проводили под действием импульсного лазера в диапазоне энергий импульса 1–418 мкДж. В случае наностержней с самой тонкой оболочкой ($23,8 \pm 2,92$ нм) значимые изменения происходят при энергии лазера 10 мкДж. Амплитуда основного пика снижается и смещается в сторону более коротких длин волн. Это может происходить либо при уменьшении длины наностержней внутри оболочки, либо часть частиц может терять оболочку, либо оба этих явления вызывают смещение. При увеличении энергии импульса от 20 до 320 мкДж происходит дальнейшее снижение основного пика и его смещение с 910 до 850 нм. При воздействии импульсного лазера с энергией 80 мкДж в образце появляется несколько фракций наночастиц. Исходные наностержни с оболочкой из диоксидом кремния, часть наночастиц, которая разрушает оболочку и образует наносферы, в оболочке от них остаются лишь силуэты. А также часть частиц укорачивается в размере, но при этом остается внутри оболочки. При энергии импульса 320 мкДж наступает полное разрушение наностержней.

Оболочка из диоксида кремния, покрывая золотые наностержни, препятствует плавному преобразованию стержня в шарики, поэтому не происходит возрастание пика плазмонного резонанса в области 530 нм, характерного для наносфер, даже при высоких энергиях. При высокой энергии наностержни резко модифицируются, разрушая оболочку. При этом образуются наносферы маленького диаметра, которые не вносят большого вклада в плазмонный резонанс около 530 нм.

В случае с оболочкой, у которой толщина составляет $30,48 \pm 3,03$ нм, старт фотомодификации начинается также при энергии лазера 10 мкДж. При увеличении энергии в диапазоне от 20 до 370 нм, также как и с оболочкой $23,8 \pm 2,92$ нм, происходит снижение амплитуды основного пика плазмонного резонанса, уширение и смещение в область более коротких длин волн. При энергии лазера 40 мкДж около 25% исходных частиц трансформируются в

наностержни, разрушая оболочку из диоксида кремния. При росте энергии до 370 мкДж наностержни фрагментируются и превращаются в мелкие шарики.

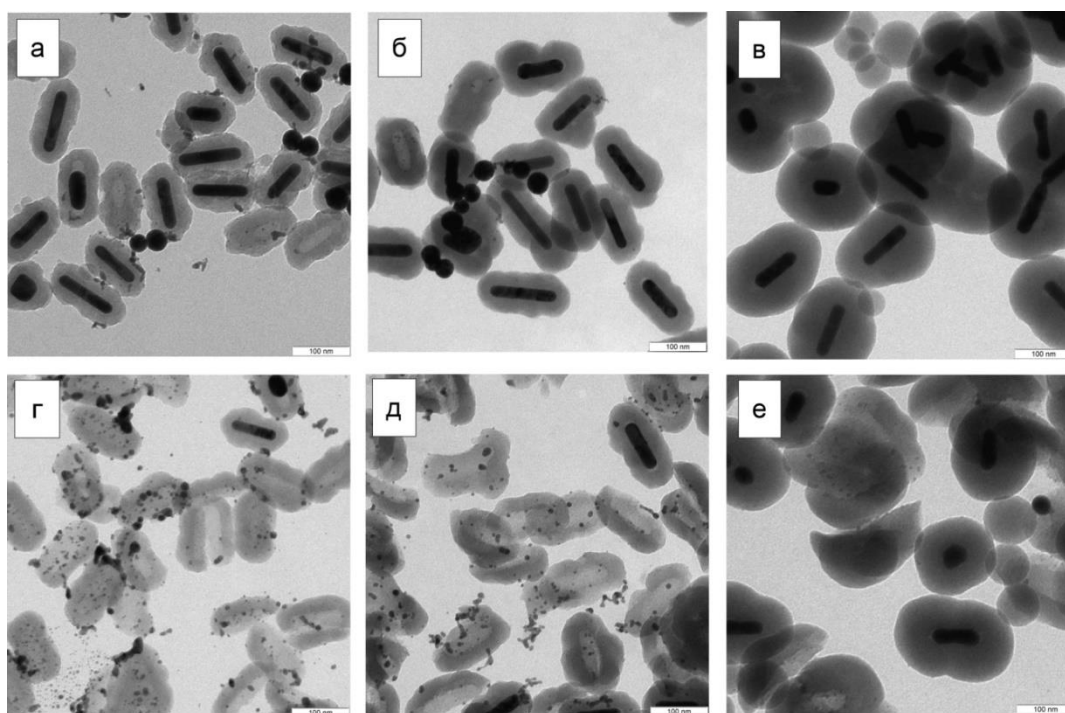


Рисунок 13 – ПЭМ-изображения наностержней с оболочкой толщиной $23,8\pm 2,9$ нм после воздействия лазера с энергией импульсов 80 (а) и 320 мкДж (г). Наностержни с оболочкой толщиной $30,48\pm 3,03$ нм после воздействия лазера с энергией импульсов 40 (б) и 370 мкДж (д). Наностержни с оболочкой $57,26\pm 6,4$ нм после воздействия лазера с энергией импульсов 40 (в) и 370 мкДж (е)

Аналогичные изменения происходят и при толщине оболочки диоксида кремния $57,26\pm 6,4$ нм. Старт модификации наблюдается при энергии импульса 10 мкДж. При увеличении энергии пик основного ПР снижается и смещается примерно к 850 нм. Отличается от образцов с меньшей толщиной тем, что с увеличением энергии пик расширяется. При энергии 370 мкДж в образце наблюдается небольшая часть наностержней внутри оболочек, а при энергии 418 мкДж происходит полная модификация стержней в сферы.

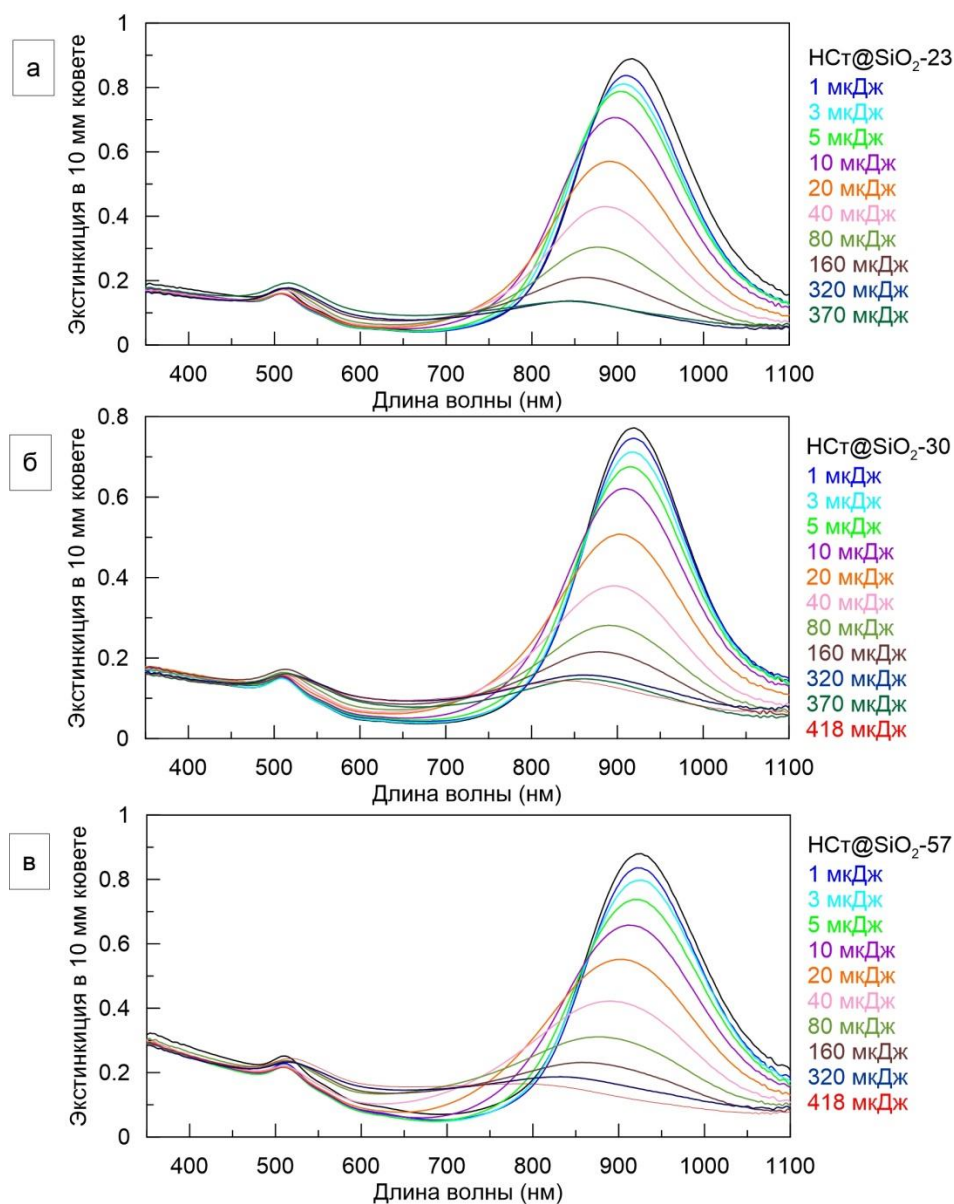


Рисунок 2 – Спектры экстинкции золотых наностержней с оболочкой из диоксида кремния со средней толщиной $23,8 \pm 2,92$ (а); $30,48 \pm 3,03$ (б) и $57,26 \pm 6,4$ нм (в) до и после фотомодификации под действием импульсного лазера с энергией импульса от 1 до 418 мкДж

Таким образом, оболочка из диоксида кремния способна увеличить фотостабильность наностержней. Тем самым увеличивается порог начала фотомодификации с 3 мкДж до 10 мкДж. А также возрастает порог полной фотомодификации с 160 до 320 мкДж. Фотостабильность практически не зависит от толщины оболочки из диоксида кремния. Для всех трех толщин порог старта фотомодификации начинается при энергии импульса 10 мкДж.

Отличия наблюдаются только в пороге полной фотомодификации, который при увеличении толщины растет с 370 до 418 мкДж.

Для дальнейшего биомедицинского применения золотых наностержней мы проверяли образцы наностержней на цитотоксичность. Количественную оценку жизнеспособности клеток измеряли с помощью спектрофлуориметрического метода с использованием реагента аламарового синего. Аламаровый синий представляет собой резазурин. Резазурин – это проникаемый для клеток краситель, который может быть восстановлен митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до флуоресцирующего соединения резорубина. Интегральная интенсивность флуоресценции резорубина на длине волны 600 нм прямо пропорциональна количеству клеток и их метаболической активности. На рисунке 3 представлены количественные оценки метаболической активности клеточных линий: фибробластов кожи крысы (А) и глиомы крысы С6 (Б) после инкубации с образцами золотых наностержней. Как видно, метаболическая активность клеток была выше порогового значения 70%. Таким образом, данные образцы золотых наночастиц не являются токсичными для обеих клеточных линий: фибробластов кожи крысы (А) и глиомы крысы С6 (Б).

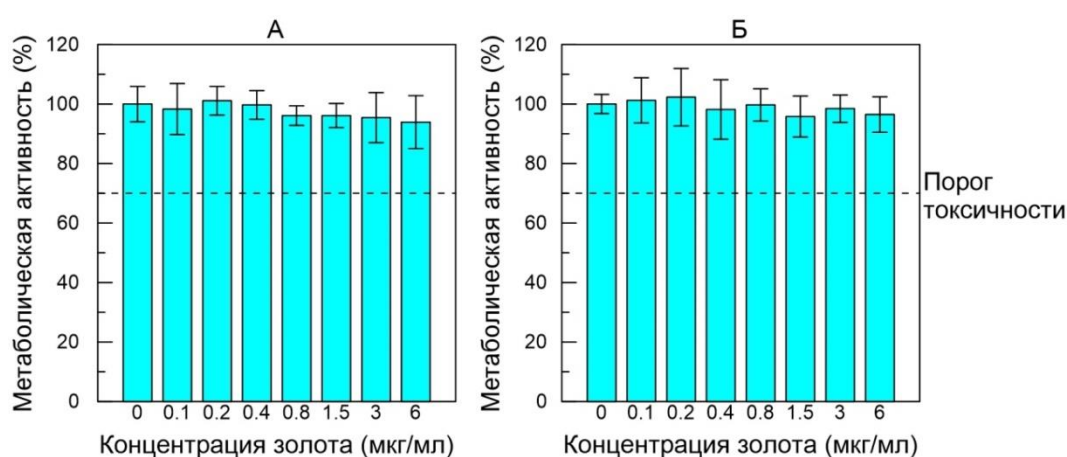


Рисунок 3 – Флуориметрическая количественная оценка метаболической активности клеточных линий фибробластов кожи крысы (А) и глиомы крысы С6 (Б) после инкубации 24 ч с золотыми наностержнями

Заключение.

Широкое распространение золотых наночастиц в биомедицине требует подробного изучения воздействия лазерного излучения, а также токсического влияния на клетки организма. В ходе проведения данного исследования была изучена фотомодификация золотых наностержней без оболочки и наностержней, покрытых оболочкой из диоксида кремния. А также была проведена оценка цитотоксического действия наночастиц на опухолевые и здоровые клетки крысы. Полученные результаты являются основой для дальнейшего использования данных частиц в биомедицинских приложениях.

Выводы:

1. С использованием двух поверхностно-активных веществ: ЦТАБ и олеата натрия (NaOl) были получены золотые наностержни со средней длиной $83,2 \pm 6,2$ нм и с шириной $18,9 \pm 1,3$ нм. Длинноволновый плазмонный резонанс был настроен на 900 нм, коротковолновый ПР – на 530 нм.

2. Было синтезировано 3 образца золотых наностержней с оболочкой из диоксида кремния толщиной $23,8 \pm 2,92$; $30,48 \pm 3,03$ и $57,26 \pm 6,4$ нм.

3. При синтезе оболочки из диоксида кремния на золотых наностержнях происходит смещение плазмонного резонанса в сторону инфракрасного излучения. При толщине $23,8 \pm 2,92$ нм происходит смещение ПР с 900 до 910 нм, при толщине оболочки $30,48 \pm 3,03$ нм резонанс сдвигается с 900 до 920 нм, в случае с оболочкой $57,26 \pm 6,4$ нм – до 935 нм. Также при максимальной толщине в спектре наблюдается рост интенсивности в области коротких длин волн, который связан с образованием большого объема диоксида кремния.

4. При исследовании фотомодификации золотых наностержней при движении по капилляру с разной скоростью с помощью электронной микроскопии и спектроскопии экстинкции было обнаружено, что при скорости 15 мм/с в образце образуется 3 фракции наночастиц: исходные стержни, ф-частицы и сферы. С уменьшением скорости движения уменьшается доля исходных золотых наностержней и увеличивается доля наносфер.

5. При исследовании влияния покрытия наностержней оболочкой из диоксида кремния на фотостабильность наночастиц было обнаружено, что даже самая тонкая оболочка ($23,8 \pm 2,92$ нм) заметно повышает порог начала фотомодификации. Для стержней без оболочки старт фотомодификации наблюдается при 3 мкДж, с оболочкой она начинается при 10 мкДж. К тому же повышается не только начальный порог, но и порог полной фотомодификации частиц, при которой практически все стержни превращаются в сфер, поднимается со 160 до 320 мкДж.

6. Оболочка из диоксида кремния увеличивает порог фотомодификации золотых наностержней, однако практически отсутствует зависимость фотостабильности от толщины этой оболочки. Для всех значений толщины оболочки $23,8 \pm 2,92$; $30,48 \pm 3,03$ и $57,26 \pm 6,4$ нм характерным началом фотомодификации является энергия лазера 10 мкДж. Отличия наблюдаются только в пороге полной фотомодификации, который растёт с 320 до 418 мкДж с увеличением толщины оболочки.

7. Анализ количественной оценки метаболической активности клеток под действием золотых наностержней показал, что данные наночастицы не проявляют цитотоксических эффектов в диапазоне концентраций от 0,1 до 6 мкг/мл.

Сур