

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
**«Саратовский национальный исследовательский государственный
университет имени Н.Г. Чернышевского»**

На правах рукописи

СТЕЦЮРА ИННА ЮРЬЕВНА

**ДИСТАНЦИОННО ПЕРЕМЕЩАЕМЫЕ СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ
ЭФФЕКТА ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЙНИЯ
СВЕТА ДЛЯ *IN VITRO* ИССЛЕДОВАНИЙ**

03.01.02 – Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук

Саратов - 2016

Работа выполнена на кафедре физики полупроводников факультета нано- и биомедицинских технологий ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель:

доктор химических наук, доцент **Горин Дмитрий Александрович**

Официальные оппоненты:

Афанасьева Галина Александровна, д.м.н., доцент, заведующая кафедрой патологической физиологии имени академика А. А. Богомольца ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Саратов).

Драчев Владимир Прокопьевич, к.ф.-м.н., профессор центра фотоники и квантовых материалов автономной некоммерческой образовательной организации высшего профессионального образования «Сколковский институт науки и технологий» (г. Москва).

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Защита диссертации состоится 26 сентября 2016 года в 18:00 в корпусе 3, аудитория 34 на заседании ученого совета Д212.243.05 на базе Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского по адресу: 410012 г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Автореферат разослан _____ 2016 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н., профессор

Павлов Алексей Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Идентификация биологически важных молекул, определение их концентраций и анализ на основе полученных данных биохимических процессов, происходящих в живых системах, играют важную роль в биофизике клетки и биофизике сложных систем. В связи с этим, популярность приобретают неинвазивные методы колебательной спектроскопии, такие как спектроскопия комбинационного рассеяния (КР), которые обладают достаточно высоким пространственным и временным разрешением, а, значит, могут предоставить большое количество информации об анализируемых объектах. Однако эти параметры нередко оказываются недостаточными для изучения живых систем. Чувствительность спектроскопии КР может быть улучшена в случае, когда неупругое рассеяние детектируется с участка в непосредственной близости от поверхности металлической наноструктуры благодаря эффекту гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР). Этот эффект позволяет существенно повысить чувствительность до уровня обнаружения единичных молекул вещества и увеличить разрешающую способность, что, в частности, открывает возможность мониторинга биохимических процессов *in vivo*. ГКР открывает большие перспективы также в молекулярной спектроскопии биообъектов. Применение ГКР в биофизике и медицине до середины 90-х [1; 2] в основном включало в себя обнаружение аминокислот, пептидов, пурина и пиримидина, а также высокомолекулярных соединений, таких как белки, ДНК и РНК. Позднее с помощью ГКР также были изучены натуральные красители, такие как хлорофиллы и другие пигменты, а также биоактивные молекулы, содержащие хромофоры, например, такие как гем-содержащие белки. Другое перспективное применение ГКР в области медицины и фармакологии заключается в детектировании лекарственных препаратов [3] для изучения их фармакокинетики. Кроме того, методика ГКР интересна не только как техника ультрачувствительного обнаружения и характеристики биомолекул, но и как техника для изучения вне- и внутриклеточных биофизических процессов. С

помощью ГКР возможно исследование процесса транспорта биологически активных молекул через мембрану, наблюдение различных времен проникновения и темпов роста концентрации в итоговом растворе [4]. Благодаря высокому разрешению по времени эффект ГКР также представляет интерес для изучения процессов переноса заряда, например, в цитохроме [5], который был досконально исследован на покрытых серебром электродах.

В настоящее время существует большое разнообразие ГКР-платформ, которые можно разделить на 2 большие группы: стационарные (твердые тонкие пленки [6], металлические покрытия, нетканые материалы[7]) и коллоиды (серебряные и золотые наночастицы (НЧ) в форме сфер, призм, звезд, нитей и др.) [8]. Однако все они имеют свои недостатки для применения *in vivo* или *in vitro*, например, такие как потеря коллоидной и оптической стабильности в течение долгого времени, или невозможность визуализации методом оптической микроскопии. Таким образом, необходимо создание мобильных сенсорных систем нового поколения, основными требованиями к которым являются обеспечение высокого фактора усиления, генерация воспроизводимого и равномерного сигнала, высокая стабильность в течение срока хранения, простота изготовления и возможность использования лазера с длиной волны ближнего инфракрасного диапазона (окно прозрачности биологической ткани), малое время накопления сигнала, использование низкой мощности лазера, биосовместимость поверхности платформы, способность к разложению и выведению из организма веществ, которые используются для получения платформ, размер и форма, оптимизированные для внедрения в живые клетки. Получение таких структур предъявляет и ряд требований к используемой методике создания платформ ГКР. Кроме того, платформы должны обеспечивать возможность визуализации современными биомедицинскими методами, а измерения и мониторинг живых организмов *in vivo* часто требуют реализации возможности перемещения платформ ГКР. Также стоит отметить, что в

современных работах мало внимания уделяется исследованию биосовместимости и токсичности платформ ГКР.

Цель и задачи диссертационной работы

Целью работы является разработка и создание нового вида мобильных и биосовместимых платформ гигантского комбинационного рассеяния на основе структур «ядро-оболочка» для вне- и внутриклеточных исследований.

Для выполнения цели работы необходимо было решить следующие **задачи**:

- создание структур «ядро-оболочка» методом последовательной адсорбцией на основе микрочастиц из CaCO_3 или SiO_2 ;
- подбор компонента оболочки, который возможно использовать в качестве метки, встроенной в платформу ГКР для идентификации ее расположения в сильно рассеивающих средах, которыми являются большинство биологических жидкостей;
- создание платформ ГКР с возможностью их перемещения с помощью оптического пинцета в культуральной среде, а также в смеси глицерина с водой, вязкость которой находится в интервале значений вязкости крови;
- отработка методики создания микрочастиц, содержащих НЧ магнетита (Fe_3O_4), для последующего формирования методом последовательной адсорбции полиэлектролитов платформ ГКР с возможностью реализации управления их пространственной ориентацией и перемещением под действием магнитного поля;
- определение эффективности полученных платформ ГКР для идентификации биологически важных веществ и веществ, используемых в тканевой инженерии;
- внутриклеточное исследование клеток мышинных фибробластов линии L929 с помощью платформ ГКР на основе микрочастиц CaCO_3 или SiO_2 и оболочки, включающей НЧ аддуктов нанокластеров углерода (АНКУ), и покрытой НЧ золота;

- создание нетканых материалов для применения в качестве внеклеточных матриксов, содержащих платформы ГКР на основе микрочастиц CaCO_3 с включениями из НЧ Fe_3O_4 .

Научная новизна работы

- Созданы платформы ГКР на основе микрочастиц ватерита или SiO_2 в качестве ядра и оболочки, созданной методом последовательной адсорбции полиэлектролитов и НЧ АНКУ, играющих роль метки КР для обнаружения объектов в сильно рассеивающих средах, с последующим формированием на их поверхности плазмонных НЧ (золота или серебра) методом химического восстановления;
- Платформы ГКР протестированы на веществах используемых в тканевой инженерии в качестве матриксов, таких как поливиниловый спирт, поли-L,L(D,L)-молочная и гиалуроновая кислоты;
- получены данные о токсичности как самих платформ ГКР разного состава, так и их компонентов: микрочастиц ватерита, содержащих НЧ Fe_3O_4 , нетканых материалов на основе поликапролактона с включениями из платформ ГКР;
- показана возможность перемещения платформ ГКР в различных средах, в том числе, и культуральной питательной среде, закрепление платформ ГКР на поверхности клетки фибробластов L929 с последующей их интернализацией и внутриклеточными исследованиями с помощью ГКР;
- показана возможность управления и взаимного расположения платформ ГКР на основе микрочастиц из CaCO_3 и включений из НЧ Fe_3O_4 с помощью магнитного поля;
- созданы матриксы на основе нетканого материала из поликапролактона с включениями, содержащими платформы ГКР на основе микрочастиц из CaCO_3 с включениями из НЧ Fe_3O_4 .

Научная и практическая значимость результатов

- Многофункциональные платформы ГКР, созданные методом последовательной адсорбции, наряду с усилением сигнала КР позволяют реализовать лазерную гипертермию благодаря одновременному наличию в оболочке НЧ серебра в качестве "горячих точек" и "тепловых приемников" из НЧ АНКУ, эффективно распределяющих тепло по всей поверхности платформы;
- с использованием предложенных платформ ГКР становится возможным реализация мониторинга роста ткани *in situ* без нарушения условий роста в биореакторе с помощью детектирования изменений концентраций веществ, являющихся продуктом митоза клеток, таких как молочная кислота или гиалуроновая кислота, или с помощью детектирования изменения содержания глюкозы в питательной структуре;
- продемонстрирована возможность создания мобильных сенсоров для внутриклеточных исследований, перемещаемых за счет технологии оптического пинцета или градиента магнитного поля;
- предложенные в работе платформы ГКР могут быть легко идентифицированы в сложных рассеивающих средах, к которым можно отнести практически все биологические жидкости, за счет использования в составе одного из слоев структуры «ядро-оболочка» упорядоченных углеродных структур (аддуктов нанокластеров углерода), имеющих интенсивный характерный сигнал в спектре КР;
- встраивание ГКР-платформ в нетканые материалы позволяет создать многофункциональный внеклеточный матрикс для выращивания клеточных культур и одновременного неинвазивного мониторинга их состояния, что играет важную роль в развитии методов трансплантационной медицины.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Обнаружения платформ ГКР типа «ядро-оболочка» в сильно рассеивающих средах обеспечивается введением в их состав углеродных наночастиц (аддуктов нанокластеров углерода), дающих воспроизводимый сигнал, обусловленный колебаниями атомов углерода в sp^2 -гибридизации, интенсивность которого пропорциональна числу нанесенных слоев аддуктов нанокластеров углерода. Такой состав платформ позволяет использовать их в качестве сенсоров для обнаружения веществ, имеющих важное биологическое значение и используемых в тканевой инженерии, а именно поливинилового спирта, поли-L,L(D,L)-молочных и гиалуроновой кислот.
2. В отличие от использования микрочастиц ватерита, применение микросфер из диоксида кремния для создания платформ гигантского комбинационного рассеяния типа «ядро-оболочка», сформированной последовательным нанесением слоев полиаллиламина и углеродных наночастиц (аддуктов нанокластеров углерода) и химическим восстановлением золота на ее поверхности, обеспечивает возможность манипулирования платформами с помощью оптического пинцета в культуральной среде, содержащей мышинные фибробласты (линия L929).
3. Применение оболочки платформы ГКР из последовательно адсорбированных слоев полиаллиламина и углеродных наночастиц (аддуктов нанокластеров углерода) с последующим химическим восстановлением золота позволило добиться получения идентифицируемого сигнала ГКР при использовании инфракрасного лазера (785 нм) в интервале мощностей безопасных для клеточных культур, а создание сенсоров микронного размера позволило проводить локализованные дистанционные внутриклеточные исследования живых клеток.

Достоверность результатов следует из корректного использования предварительно апробированных методик исследования с использованием современного оборудования: спектрометра комбинационного рассеяния Интегра Спектра (Россия), спектрометра Renishaw inVia (Великобритания), электронного микроскопа Tescan Mira // LMU (Tescan, Чехия) и др. Измерения проводились многократно с последующим статистическим усреднением, также многократно проводился синтез исследуемых образцов. Достоверность полученных результатов подтверждается воспроизводимостью полученных данных в пределах установленных погрешностей, также результаты не противоречат данным, опубликованными другими авторами.

Личный вклад автора диссертации состоит в получении частиц, используемых в качестве ГКР-платформ, исследовании образцов методами спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния, динамического рассеяния света, лазерной сканирующей микроскопии и обработке данных, в написании и подготовке текстов статей к публикации. Постановка задач исследования и анализ результатов проводился автором при консультировании и под руководством проф. Горина Д.А. Исследования с помощью электронной микроскопии проводились совместно с к.ф.-м.н. Захаревичем А.М. (лаборатория диагностики наноматериалов и структур образовательного научно-исследовательского института наноструктур и биосистем СГУ), а также совместно с Роней Пичке (институт Макса Планка Коллоидов и Поверхностей, Гольм, Германия). Изучение биосовместимости полученных структур проводилось совместно с к.б.н. Видяшевой И.В. (отдел клеточной инженерии образовательного научно-исследовательского института наноструктур и биосистем СГУ), а также Дроздовой М.Г. под руководством Марквичевой Е.А. (институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Эксперименты на установке оптического пинцета проводились в лаборатории нанооптики и

метаматериалов МГУ при содействии научной группы д.ф.-м.н., проф. Федянина А.А..

Публикации по теме диссертации и апробация результатов

Основные результаты диссертации опубликованы в 13 работах, из них 5 статей в рецензируемых изданиях, включенных в перечень ВАК, 8 тезисов и публикаций в сборниках трудов научных конференций.

Основные результаты диссертационной работы доложены на конференциях (10 устных докладов и 1 постер):

- VI Международный научный семинар «Наночастицы, нанопокрyтия и микроконтейнеры: технология, свойства, применение», 21-24 мая 2015 г., Саратов, РФ;
- V Международный научный семинар «Наночастицы, нанопокрyтия и микроконтейнеры: технология, свойства, применение», 7-13 мая 2014 г., Гент, Бельгия;
- 8ой международный симпозиум «Молекулярный порядок и подвижность в полимерных системах», 2-6 июня 2014 г., Санкт-Петербург, Россия;
- IV Международный научный семинар «Наночастицы, нанопокрyтия и микроконтейнеры: технология, свойства, применение», 5 – 9 мая 2013 г., Потсдам, Германия;
- Всероссийская школа-конференция "Химия биологически активных веществ" молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием "ХимБиоАктив-2012", 24-28 сентября 2012 г., Саратов, Россия;
- Saratov Fall Meeting 2012, International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics and Biophysics, 25 – 28 сентября 2012 г., Саратов, Россия;
- German-Russian Conference on Fundamentals and Applications of Nanoscience, 19 – 21 мая 2012 г., Берлин, Германия;

- Saratov Fall Meeting 2011, International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics and Biophysics, 27 – 30 сентября 2011 г., Саратов, Россия;
- Программа «Участник молодежного научно-инновационного конкурса 2011», в рамках конференции «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине», 25-27 октября 2011 г. СГУ, Саратов, Россия;
- Saratov Fall Meeting 2009, International School for Junior Scientists and Students on Optics, Laser Physics and Biophysics, 21-24 сентября 2009 г., Саратов, Россия.

Повышение квалификации, проведение совместных исследований по теме диссертации и обсуждение их результатов осуществлялись соискателем в ходе

стажировок в институте биомедицинской инженерии общества Фраунгофера (Потсдам-Гольм, Германия) в рамках программы DAAD «Научно-исследовательские стипендии для молодых ученых» и в университете королевы Марии (Лондон, Великобритания) в рамках стипендии Президента РФ для направляемых на обучение за рубеж в 2014/15 учебном году (Приказ Минобрнауки от 28 мая 2014 года № 595)

и международных школ:

- 1-ая Международная школа «Nanostructured Materials», 18-20 мая 2015 г., Саратов;
- Ежегодная всероссийская научная школа-семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине-2011», 25-27 октября 2011 г., Саратов;
- 2-ая Международная школа «Нanomатериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и медицина», 2011, Москва.

Работа соискателя и участие в мероприятиях по теме диссертации были поддержаны персональными грантами:

- Индивидуальный грант в форме субсидии из федерального бюджета в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»;
- Индивидуальный грант на выполнение НИР «Разработка платформ гигантского комбинационного рассеяния на основе микроструктур «ядро-оболочка», содержащих наночастицы астралена, и их применение для детектирования биологически активных молекул» № 17258 в рамках программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («У.М.Н.И.К.»), 2013;
- Индивидуальный грант на выполнение НИР "Surface Enhancement Raman Scattering platform controlled by laser and magnetic field for tissue engineering" в рамках программы DAAD «Научно-исследовательские стипендии для молодых ученых», 2013 г.;
- Индивидуальный грант на выполнение НИР «Разработка технологии создания структур «ядро-оболочка» и упорядоченных платформ на их основе, усиливающих сигнал комбинационного рассеяния» № 14246 в рамках программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («У.М.Н.И.К.»), 2012.

Исследования по теме диссертации проводились соискателем в качестве исполнителя ряда проектов, поддержанных грантами

- Исполнитель по гранту РФФИ № 16-08-00524 «Формирование регулируемого освещением пространственного и потенциального рельефа на границе раздела "полупроводник-органическое покрытие"» (2016);
- Исполнитель по гранту РФФИ 14-02-31089-мол-а «Создание хемо- и биосенсоров на основе гибридных структур "полупроводник-органический слой-нанообъекты"» (2015);

- Исполнитель РФФИ 12-03-33088-мол-а-вед «Дистанционно управляемые наноструктурируемые материалы, включающие биосенсоры и инкапсулированные биоактивные вещества» (2012-2015);
- Исполнитель по гранту РФФИ 11-08-12058-офи-м-2011 «Создание мультфункциональных нанокompозитных структур с возможностью адаптации их физико-химических свойств под воздействием ионизирующего и лазерного излучений» (2011-2012);
- Исполнитель по гранту РФФИ 09-03-0245-а «Функционализация поверхности дисперсной фазы эмульсионных систем неорганическими наночастицами» (2009-2011).
- Исполнитель по гранту Правительства Российской Федерации №14.Z50.31.0004 для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, научных учреждениях государственных академий наук и государственных научных центрах Российской Федерации.

Объем и структура работы

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, списка использованных источников, включающего 179 источников. Общий объем диссертации составляет 134 страницы, включая 56 рисунков и 4 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** описана актуальность темы исследования, раскрыта новизна работы и ее практическая значимость, а также сформулированы цель и задачи исследования, вынесены основные положения.

В **первой главе** представлен аналитический обзор по теме диссертации. В ней рассмотрены основные механизмы возникновения эффекта гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР). Проанализированы основные способы реализации эффекта ГКР с помощью платформ, описаны методики их получения и особенности каждого типа платформ. Приведен анализ результатов работ по

изучению клеток, тканей с помощью ГКР, рассмотрены различные схемы детектирования аналита: собственное, не прямое собственное и несобственное. Отдельно рассмотрены методы реализации передвижения объектов, в частности ГКР-платформ, *in vitro* и *in vivo* с помощью оптического пинцета, градиента магнитного поля и акустических полей. Кроме того, описаны различные матриксы для тканевой инженерии, в том числе из нетканых материалов, их свойства и возможность их характеристики с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния (КР).

Вторая глава посвящена описанию использованных в ходе работы материалов, методов получения микрочастиц CaCO_3 , нанокompозитных оболочек методом последовательной адсорбции, композитных волокон методом. На рисунке 1 схематично показаны этапы формирования структур «ядро-оболочка». Также описаны методики исследования образцов с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), спектроскопии КР, энергодисперсионного и рентгенофазового анализа, описаны установка оптического пинцета и методика измерения образцов на цитотоксичность.

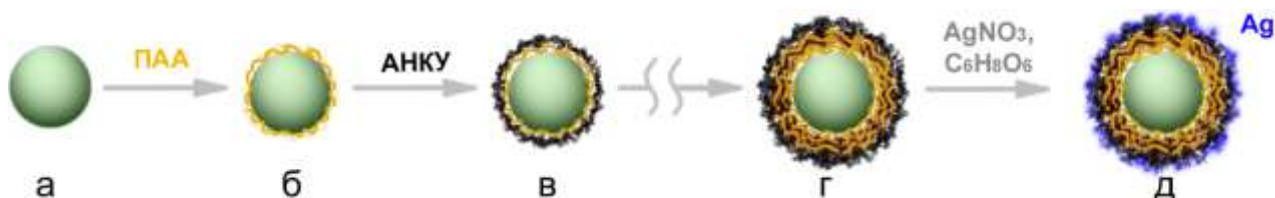


Рисунок 1 – Этапы формирования платформ ГКР методом послойной адсорбции: а – ядро из карбоната кальция или диоксида кремния; б-г – попеременное нанесение слоев полиэлектролита и наночастиц АНКУ; д – восстановление серебра на поверхности структуры «ядро-оболочка»

Третья глава посвящена описанию результатов создания и характеристики платформ для гигантского комбинационного рассеяния на основе ядра из CaCO_3 или SiO_2 и композитной оболочки из полиэлектролита и НЧ аддуктов нанокластеров углерода (АНКУ), покрытых наночастицами серебра или золота. С целью оптимизации технологии получения платформ ГКР было изучено влияние числа циклов адсорбции АНКУ на морфологию поверхности структур «ядро-оболочка» и на спектры КР. Формирование слоя с

АНКУ существенно изменяет морфологию поверхности микрочастиц CaCO_3 (рисунок 2), характерно появление большого количества граней. Из анализа изображений СЭМ очевидно, что при использовании большей концентрации АНКУ грани образуются стабильно на всех этапах. Если говорить о применении пика АНКУ в качестве метки для обнаружения точного местоположения платформы в сложных рассеивающих средах, то наиболее эффективной окажется платформа с тремя слоями АНКУ. Из рисунка 3, на котором представлено распределение интенсивности пика в интервале $1500 - 1650 \text{ см}^{-1}$, видно, что частицы АНКУ распределены равномерно в пределах одной структуры, а, следовательно, пик АНКУ может служить меткой.

Серебряные НЧ усиливают характерный спектр частиц $\text{CaCO}_3/(\text{ПАА}/\text{АНКУ})_3$. Так, хорошо определяемый пик частиц АНКУ (G-мода), встроенных в оболочку платформ, покрытых серебряными частицами, был получен при низких мощностях лазера, 1 и 0,1 мВт (рисунок 4).

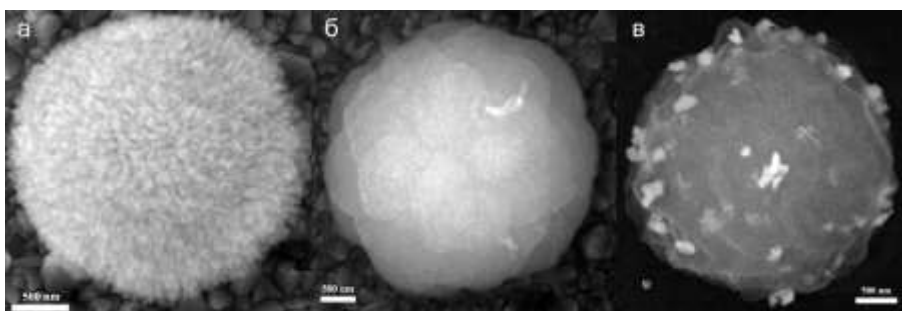


Рисунок 2 – СЭМ изображения а – микросфер CaCO_3 , использованных в качестве «ядер» для ГКР платформ; структур ГКР платформ на основе микросфер CaCO_3 и оболочек $(\text{ПАА}/\text{АНКУ})_3$: б – до и; в – после восстановления серебра на поверхности [Л1]

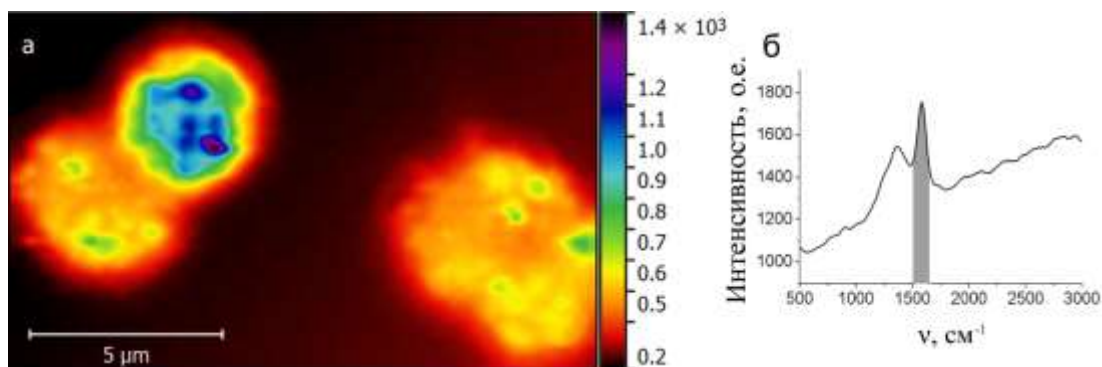


Рисунок 3 – а - распределение интенсивности спектра КР структуры $\text{CaCO}_3/(\text{ПАА}/\text{АНКУ})_3$ при мощности лазера 0,1 мВт с длиной волны 473 нм в интервале $1500 - 1650 \text{ см}^{-1}$; б - характерный спектр КР структуры $\text{CaCO}_3/(\text{ПАА}/\text{АНКУ})_3$ при мощности лазера 0,1 мВт и длине волны 473 нм [Л1]

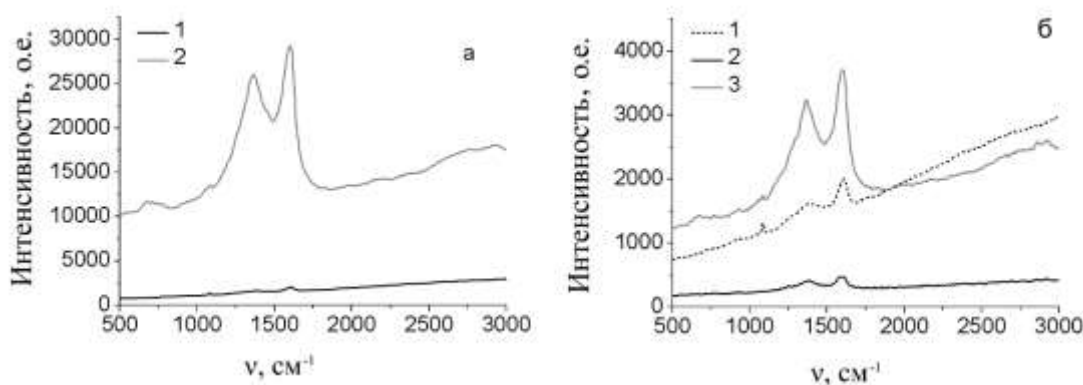


Рисунок 4 – а - Спектр КР полученных микросфер со структурой: а) 1 (черная линия) – $\text{CaCO}_3/(\text{PAA}/\text{АНКУ})_3$; 2 (серая линия) – $\text{CaCO}_3/(\text{PAA}/\text{АНКУ})_3/\text{Ag}$. Использованная мощность лазера 10 мВт; б - 1 (пунктирная линия) – $\text{CaCO}_3/(\text{PAA}/\text{АНКУ})_3$ при мощности лазера 10 мВт; 2 (черная линия) – $\text{CaCO}_3/(\text{PAA}/\text{АНКУ})_3/\text{Ag}$ при мощности лазера 0.1 мВт; 3 (серая линия) – $\text{CaCO}_3/(\text{PAA}/\text{АНКУ})_3/\text{Ag}$ при мощности лазера 1 мВт [Л1]

Важно, что подобный диапазон мощностей уже может быть использован для исследования биологических объектов, в том числе *in vivo*, и проведения анализов интерфейса ткань-имплант. Таким образом, полученные платформы ГКР могут использоваться как биосенсоры для картирования и снятия одиночных спектров.

Мониторинг компонентов внеклеточного матрикса является важной и актуальной задачей для создания искусственных матриксов для выращивания клеточных культур. Приведены результаты детектирования веществ, используемых для получения матриксов: поливинилового спирта (ПВС), поли – D,L – молочной кислоты (ПДЛМК), поли – L – молочной кислоты (ПЛМК). Усиленные спектры перечисленных веществ, снятые с помощью платформ структурой $\text{CaCO}_3/(\text{PAA}/\text{АНКУ})_3/\text{Ag}$, представлены на рисунке 5.

Также с помощью полученных платформ были получены спектры ГКР гиалуроновой кислоты, часто используемой для создания внеклеточных матриксов и, кроме того, являющейся продуктом митоза клеток. Таким образом, с помощью детектирования изменения концентрации гиалуроновой кислоты возможно реализовать мониторинг роста клеток ткани *in situ* в биореакторе, не нарушая условий роста.

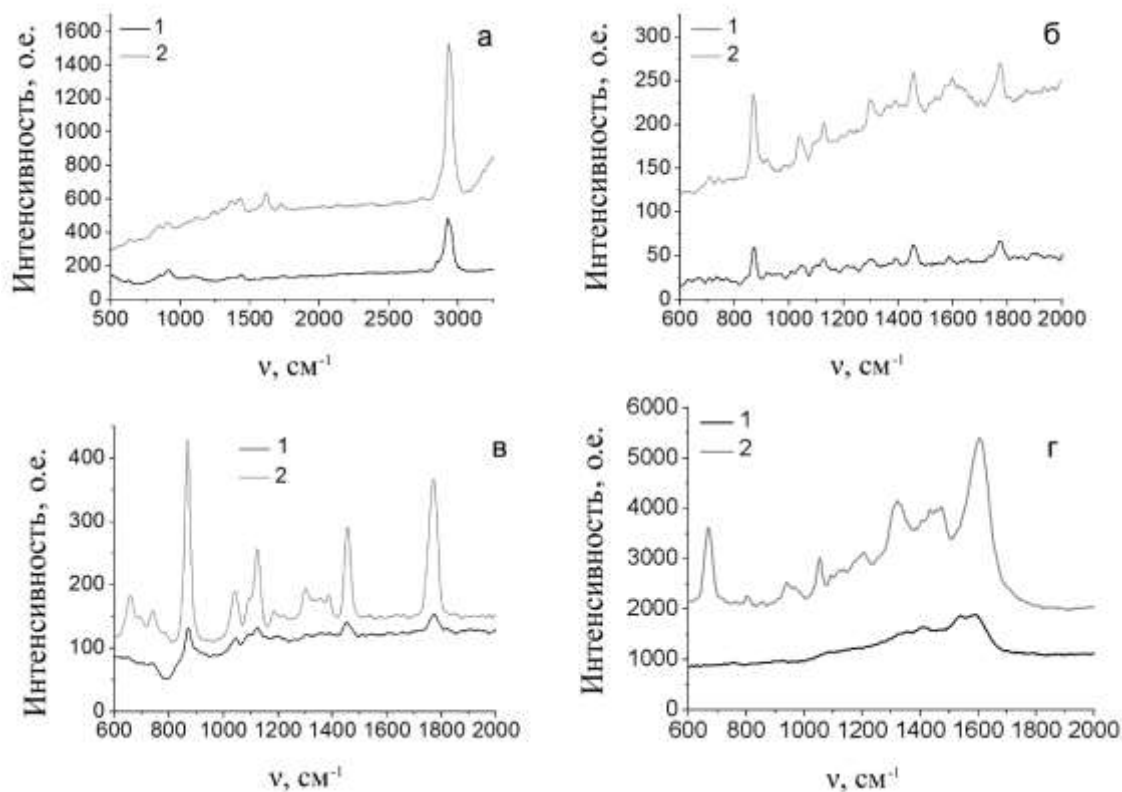


Рисунок 5 - Спектры КР матриц для культивирования клеток на основе: а - ПВС, б - (ПЛМК), в – ПДЛМК, полученные без (черная линия) и с (серая линия) использованием платформ ГКР $\text{CaCO}_3/(\text{ПАА}/\text{АНКУ})_3/\text{Ag}$. Использовался лазер мощностью 10 мВт и длиной волны 473 нм.

г - Спектр КР гиалуроновой кислоты без (черная линия) и с (серая линия) использованием платформ ГКР на основе частиц $\text{CaCO}_3/(\text{ПАА}/\text{АНКУ})_3/\text{Ag}$. Использовался лазер с длиной волны излучения 473 нм и мощностью 1 мВт [Л1]

В четвертой главе показана возможность перемещения ГКР платформ на основе структур «ядро-оболочка» в клеточной среде с помощью оптического пинцета. Было проведено исследования влияния состава ядра и металлического покрытия платформы гигантского комбинационного рассеяния на возможность передвижения с помощью оптического пинцета в культуральной среде. Были подготовлены платформы ГКР следующих составов: $\text{SiO}_2/(\text{ПАГ}/\text{АНКУ})_3/\text{Au}$, $\text{SiO}_2/(\text{ПАГ}/\text{АНКУ})_3/\text{Ag}$, $\text{CaCO}_3/(\text{ПАГ}/\text{АНКУ})_3/\text{Au}$, $\text{CaCO}_3/(\text{ПАГ}/\text{АНКУ})_3/\text{Ag}$. Удержание и последующее перемещение осуществлялись с помощью импульсно-периодического фемтосекундного лазера инфракрасного диапазона. Платформы ГКР на основе ядра из CaCO_3 не захватывались лазерной ловушкой, что может быть объяснено высокими рассеивающими свойствами или высокой оптической плотностью таких частиц, а, значит, в этом случае возникающая за

счёт экстинкции света в частицах выталкивающая сила давления света превосходит суммарную силу удержания платформы в ловушке за счёт градиента интенсивности. Важно отметить, что в отличие от серебряных частиц, пик поглощения золотых частиц смещен в красную область. Это позволяет использовать для исследований ГКР лазер инфракрасного диапазона, т.е. в диапазоне прозрачности биологической ткани, и таким образом выполнять последующий неинвазивный анализ живой ткани. Таким образом, состав платформ на основе SiO_2 с золотым покрытием оказался оптимальным для стабильного управления положением таких платформ с помощью лазерного пинцета и последующей интернализацией платформ клетками. Было продемонстрировано, что метод оптического пинцета может быть использован для точной локализации платформы ГКР в различных средах (водной среде, фосфатно-солевом буферном растворе, растворе NaCl, смеси альбумина и глицерина, культуральной питательной среде), в том числе на поверхности фибробластов мыши L929. Схематично эксперимент по захвату лазерным пинцетом платформы ГКР показан на рисунке 6. Под воздействием оптической ловушки платформа ГКР была подведена к поверхности живой клетки, что привело к сцеплению платформы с клеточной мембраной. Таким образом можно легко выбрать интересующее место для исследования на поверхности клетки с точностью до мкм. После контакта с поверхностью клеток платформы ГКР полностью интернализуются клеткой после двух часов инкубации, что подтверждено изображением конфокального лазерного микроскопа (рисунок 7).

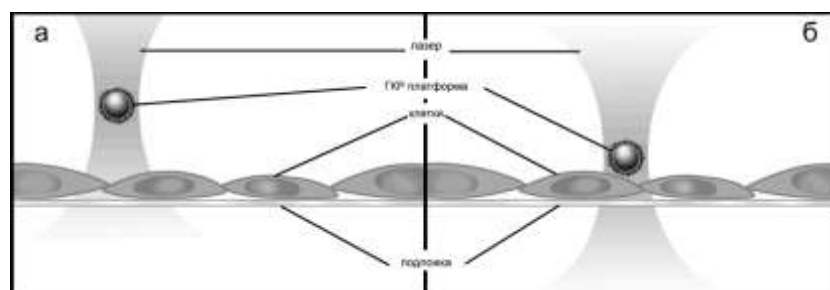


Рисунок 6 - Схема проведения эксперимента по захвату активной платформы ГКР с помощью оптического пинцета и перемещению ее к поверхности живой клетки [Л2]

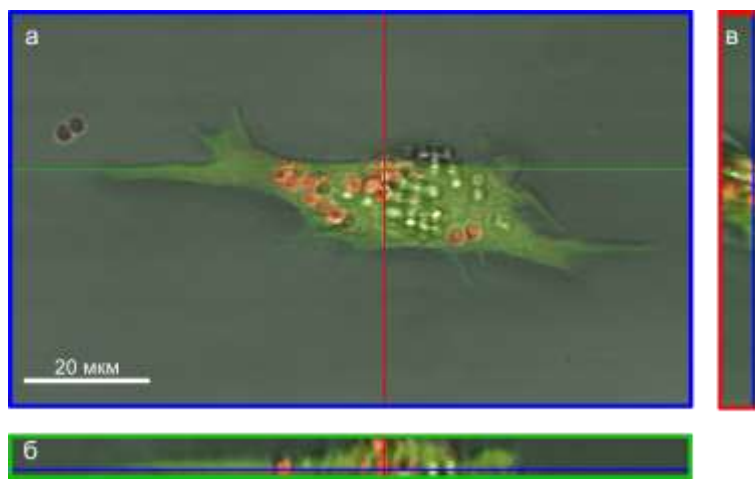


Рисунок 7 – Развертка трехмерной реконструкции, полученной из z-серии изображений конфокального лазерного сканирующего микроскопа клеток мышинных фибробластов линии L929, окрашенных с помощью кальцеина (зеленый цвет), с интернализированными платформами ГКР состава $\text{SiO}_2/(\text{ПАА-ТРИТЦ/АНКУ})_3/\text{Au}$ (красный цвет): а – проекция на плоскость XY; б – проекция на плоскость XZ, полученная вдоль зеленой линии на рисунке а; в – проекция на плоскость YZ, полученная вдоль красной линии на рисунке а [Л2]

Следующим этапом было получение спектров КР клеток при минимальной мощности лазера 0,2 мВт с длиной волны 785 нм. Такая мощность лазера является чрезвычайно низкой и не может нанести повреждений живым тканям и клеткам. На рисунке 8 приведено оптическое изображение платформы ГКР, внедренной в клетку мышинных фибробластов линии L929, и картирование распределения пиков КР, характерных для компонентов клеток. Пики в полученных спектрах из каждой точки сканированной области соответствуют внутренним компонентам клетки и типичные линии для наиболее интересных с точки зрения биофизики компонентов отмечены разными цветами на репрезентативных спектрах КР: красный – АНКУ ($1500 - 1600 \text{ см}^{-1}$), зеленый – липиды ($\sim 1656 \text{ см}^{-1}$, 1740 см^{-1}), синий – нуклеиновые кислоты (1314 см^{-1} , 1376 см^{-1} , 1479 см^{-1}).

Из скана видно, что частицы АНКУ расположены равномерно на всей поверхности микросферы. Два хорошо определяемых пятна синего и зеленого цветов показывают распределение ДНК/РНК и липидов соответственно около поверхности платформы ГКР. Можно предположить, что одной стороной

платформа касается мембраны клетки, другой частью соприкасается с ядром клетки.

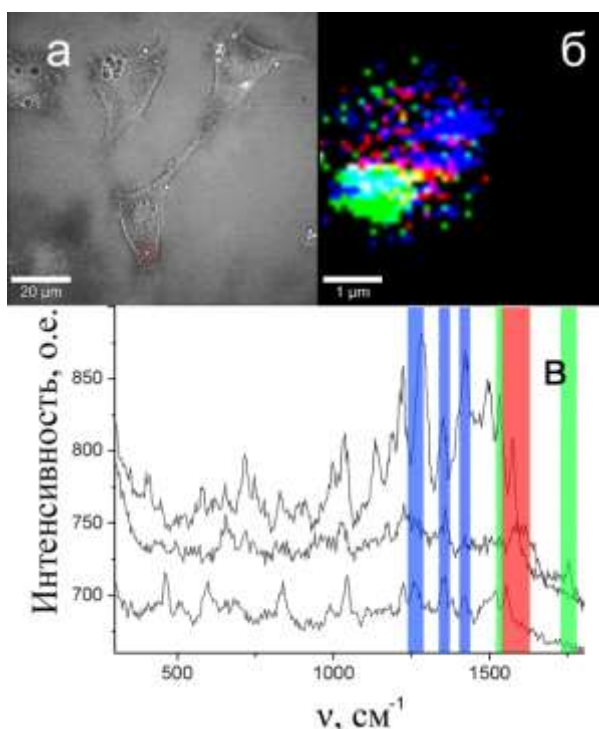


Рисунок 8 - а – Оптическое изображение клеток мышинных фибробластов линии L929 после четырех часов их инкубации с ГКР платформами состава $\text{SiO}_2/(\text{ПАА}/\text{АНКУ})_3/\text{Au}$; б – Картирование КР из области, отмеченной на рисунке а (красный квадрат), цвета на котором соответствуют характеристическим пикам на репрезентативных спектрах КР (в). Красный цвет соответствует АНКУ, синий – ДНК, зеленый – липидам. Спектры были сняты при длине волны лазера 785 нм и мощности 0,2 мВт [Л2]

Пятая глава посвящена исследованию возможности реализации управления взаимным расположением платформ ГКР под воздействием постоянного магнитного поля и их применению для создания тканеинженерных конструкций. Для отработки процесса синтеза микросфер CaCO_3 микронного размера с включениями из НЧ Fe_3O_4 было приготовлено 8 различных образцов, для которых использовались суспензии наночастиц Fe_3O_4 нестабилизированным и стабилизированным лимонной кислотой различных концентраций. Содержание Fe_3O_4 в полученных микрочастицах оказалось пропорционально концентрации Fe_3O_4 в исходной смеси солей до кристаллизации микрочастиц (рисунок 9), при этом количество нестабилизированного Fe_3O_4 в 2-4 раза больше, чем во всех идентичных образцах со стабилизированным Fe_3O_4 . Однако с

увеличением концентрации Fe_3O_4 растет и содержание кальцита в образце, причем образцы со стабилизированным Fe_3O_4 содержат большее количество кальцита, что может объясняться локальным увеличением кислотности, способствующим растворению ватерита и перекристаллизации его в кальцит. Из анализа изображений СЭМ полученных микрочастиц (рисунок 9), содержащих Fe_3O_4 , видно, что шероховатость образцов возрастает с увеличением концентрации Fe_3O_4 в их составе.

Для использования в качестве сенсоров на образце с содержанием частиц Fe_3O_4 1,5 мг/мл было проведено восстановление золота на поверхности. Под воздействием постоянного магнитного поля платформы выстраиваются в цепочки параллельно силовым линиям. Таким образом можно создавать так называемые «горячие точки», располагая платформы близко друг к другу, приведя практически в соприкосновение. Такие структуры возможно использовать и после высыхания, и в жидкости в качестве ГКР-платформ.

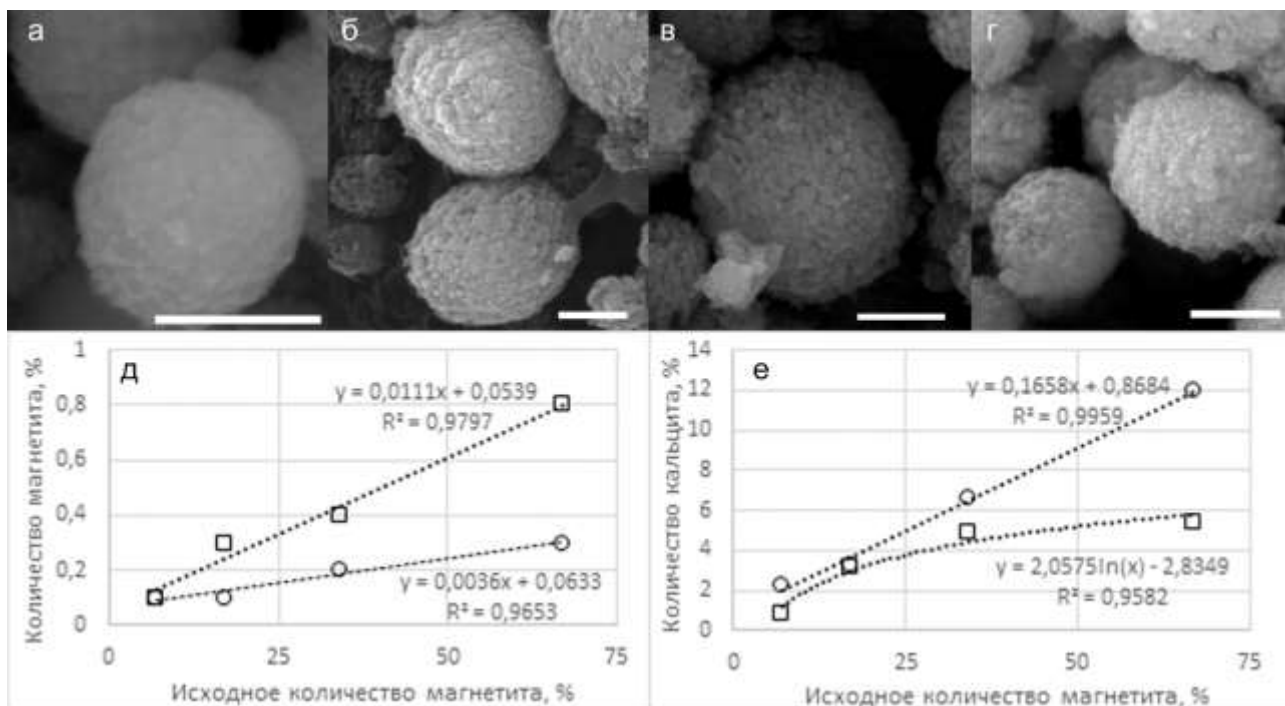


Рисунок 9 – Изображения СЭМ микрочастиц CaCO_3 , содержащих различное количество наночастиц Fe_3O_4 : а – 0,1 %, б – 0,3 %, в – 0,4 %, г – 0,8 %. Масштабные отрезки равны 1 мкм. Зависимость содержания: д – кальцита в полученных ядрах карбоната кальция от исходной концентрации магнетита в растворе; е – магнетита в полученных ядрах карбоната кальция от исходной концентрации стабилизированного (○) и нестабилизированного (□) Fe_3O_4 в растворе солей

Исследования цитотоксичности показали, что культивирование клеток в присутствии платформ ГКР, содержащих различное количество стабилизированного и нестабилизированного Fe_3O_4 , существенно не уменьшило жизнеспособность клеток мышинных фибробластов L929, что позволяет проводить биологические исследования с помощью данных платформ минимально воздействуя при этом на объект исследования.

Были получены композитные волокна на основе поликапролактона (9%), содержащие образцы микросфер CaCO_3 с наибольшим содержанием частиц Fe_3O_4 с золотым покрытием. Была протестирована эффективность сформированных ГКР платформ в матриксе с помощью модельного вещества – красителя родамина Б. Для пика 1184 см^{-1} аналитический фактор усиления составил $4 \cdot 10^5$.

Целью следующего эксперимента была демонстрация возможности использования микросфер CaCO_3 в качестве ГКР платформ после растворения матрикса нетканого материала. Для того чтобы смоделировать процесс резорбции волокон из ПКЛ к нему добавляли 10% раствор хлороформа, после чего волокна полностью растворялись и на подложке оставались только микросферы CaCO_3 , как показано на рисунке 10.

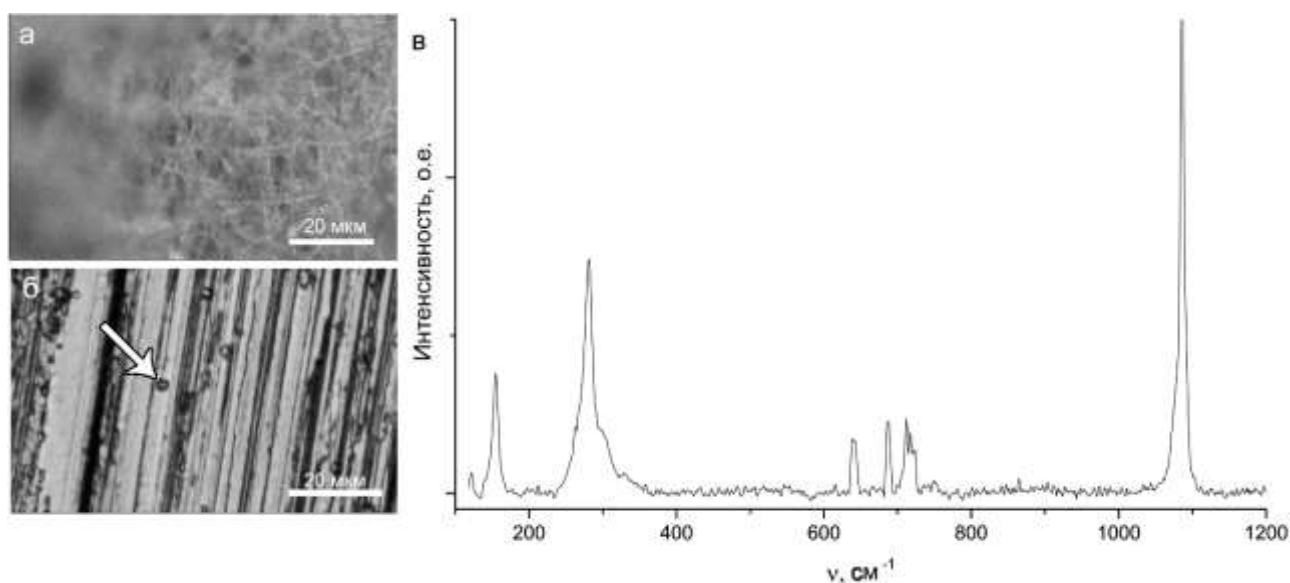


Рисунок 10 - Оптические изображения: а - волокон, содержащих микрочастицы CaCO_3 с НЧ Fe_3O_4 и покрытых золотом; б – оставшиеся ядра на подложке после растворения волокон хлороформом, в - Спектр, полученный в точке, указанной красной стрелкой

Для подтверждения того, что платформы ГКР не деформировались с сохранением их структуры, был снят спектр КР с оставшейся на подложке после растворения платформы (рисунок 10б), на котором различимы характерные пики для ватерита (105 см^{-1} , 114 см^{-1} , 267 см^{-1} , 300 см^{-1} , 740 см^{-1} , 750 см^{-1} , 1074 см^{-1} , 1090 см^{-1}) и Fe_3O_4 (680 см^{-1}).

В заключении сформулированы основные результаты и выводы, полученные в ходе выполнения диссертационной работы:

1. Созданы платформы ГКР на основе структур «ядро-оболочка», покрытых НЧ серебра или золота. Было показано, что использование углеродных упорядоченных НЧ (АНКУ) в качестве одного из слоев при последовательной адсорбции приводит к формированию развитой поверхности структур «ядро-оболочка», что необходимо для получения эффективных платформ ГКР.

2. Получен спектр ГКР на сформированных платформах на основе структур «ядро-оболочка», содержащих АНКУ, при низкой мощности лазера 0,1 мВт, который возможно использовать в качестве метки для исследований в сильно рассеивающих средах.

3. С помощью платформ на основе структур «ядро-оболочка» были получены спектры ГКР для веществ, используемых в тканевой инженерии. Рассчитанные аналитические факторы усиления составили: для поливинилового спирта – $3,1 \cdot 10^3$, поли-D,L-молочной кислоты – $8,6 \cdot 10^3$, поли-L-молочной кислоты – $2,9 \cdot 10^3$, гиалуроновой кислоты – $7,9 \cdot 10^4$.

4. Показана возможность эффективного захвата и передвижения платформ с помощью оптического пинцета в различных средах: фосфатно-солевом буферном растворе, водном растворе NaCl и культуральной среде. Также был проведен эксперимент по перемещению платформы ГКР с помощью оптического пинцета к поверхности клетки мышинных фибробластов линии L929 с последующим закреплением и интернализацией клеткой.

5. Было проведено внутриклеточное исследование клетки мышинных фибробластов линии L929 с помощью платформ ГКР на основе структур «ядро-

оболочка». При минимальной мощности лазера 0,2 мкВт, сравнимой с мощностью рассеянного солнечного излучения, и длине волны лазера 785 нм получены характерные пики АНКУ ($1500 - 1600 \text{ см}^{-1}$), липидов (1656 см^{-1} , 1740 см^{-1}), ДНК/РНК (1314 см^{-1} , 1376 см^{-1} и 1479 см^{-1}).

6. Оработана методика формирования микрочастиц CaCO_3 с включениями НЧ Fe_3O_4 методом соосаждения. Исследования показали, что по сравнению со стабилизированным нестабилизированный Fe_3O_4 встраивается в ядра в 4 раза большем количестве, чем Fe_3O_4 , стабилизированный лимонной кислотой. Причем с увеличением количества Fe_3O_4 растет и количество кальцита в образце. Образцы со стабилизированным Fe_3O_4 содержат большее количество кальцита, что может объясняться локальным увеличением кислотности, способствующим растворению ватерита и перекристаллизации его в кальцит. Таким образом, возможно контролировать точное количество Fe_3O_4 в микросферах CaCO_3 . Кроме того, показана возможность реализации управления пространственной ориентацией платформ ГКР и перемещением их под действием магнитного поля.

7. Созданы волокна на основе поликапролактона со встроенными платформами ГКР и показана возможность использования платформ ГКР до и после резорбции волокон.

8. Показано, что платформы ГКР на основе структур «ядро-оболочка» также, как и платформы ГКР на основе микрочастиц карбоната кальция, содержащих Fe_3O_4 , а также волокна с включенными платформами, не оказывают существенного влияния на жизнеспособность клеток мышечных фибробластов линии L929.

Список использованных источников

1. Koglin E., Séquaris J.-M. Surface enhanced raman scattering of biomolecules BT - Analytical Problems. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1986. С. 1–57.
2. Nabiev I., Chourpa I., Manfait M. Applications of Raman and surface-enhanced Raman scattering spectroscopy in medicine // J. Raman Spectrosc. 1994. Т. 25. № 1. С. 13–23.

3. Rupérez A., Montes R., Laserna J.J. Identification of stimulant drugs by surface-enhanced Raman spectrometry on colloidal silver // *Vib. Spectrosc.* 1991. Т. 2. № 2-3. С. 145–154.
4. Wood E. и др. Surface enhanced Raman scattering (SERS) study of membrane transport processes // *Int. J. Pharm.* 1997. Т. 154. № 1. С. 115–118.
5. Picorel R. и др. Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Spectroscopy of Plant Photosystem II Reaction Centers Excited on the Red-Edge of the Qy Band // *J. Phys. Chem. B.* 1998. Т. 102. № 15. С. 2609–2613.
6. Ko H., Singamaneni S., Tsukruk V. V. Nanostructured Surfaces and Assemblies as SERS Media // *Small.* 2008. Т. 4. № 10. С. 1576–1599.
7. Severyukhina A.N. и др. Nanoplasmonic Chitosan Nanofibers as Effective SERS Substrate for Detection of Small Molecules // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2015. Т. 7. № 28. С. 15466–15473.
8. Tripp R.A., Dluhy R.A., Zhao Y. Novel nanostructures for SERS biosensing // *Nano Today.* 2008. Т. 3. № 3-4. С. 31–37.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

- Л1. Stetsyura I.Y., Markin A.V., Ponomarev A.N., Yakimansky A.V., Demina T.S., Grandfils C., Volodkin D.V., Gorin D.A. Composite Calcium Carbonate Microspheres Coated with Astralen and Silver Nanoparticles – New SERS Platform // *Langmuir.* 2013. Vol.29(12), P. 4140–4147.
- Л2. Stetciura I.Y., Yashchenok A., Masic A., Lyubin E.V., Inozemtseva O.A., Drozdova M.G., Markvichova E.A., Khlebtsov B.N., Fedyanin A.A., Sukhorukov G.B., Gorin D.A., Volodkin D. Composite SERS-based satellites navigated by optical tweezers for single cell analysis // *Analyst.* 2015. Vol.140. P. 4981-4986.
- Л3. Stetciura I.Y., Markin A. V., Bratashov D.N., Sukhorukov G.B., Gorin D.A. Nanoencapsulated and microencapsulated SERS platforms for biomedical analysis // *Current Opinion in Pharmacology.* 2014. Vol.18. P. 149–158.

Л4. Иноземцева О.А., Сальковский Ю.Е., Северюхина А.Н., Видяшева И.В., Петрова Н.В., Метвалли Х.А., Стецюра И.Ю., Горин Д.А. Нанокompозиты на основе электроформованных волокон: получение, свойства и применение в тканевой инженерии // Успехи химии. 2015. Т.84, вып.3. С. 251 – 274.

Л5. Стецюра И.Ю., Горин Д.А. Различные типы платформ для гигантского комбинационного рассеяния и их применение // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2013. Т. 13, вып. 2. С. 84-87.

Тезисы и публикации в сборниках научных трудов:

Л6. Stetciura I.Y., Masic A., Lyubin E.V., Drozdova M.G., Paulraj T., Markvichova E.A., Fedyanin A.A., Volodkin D., Gorin D.A. Spherical microsized SERS platforms based on calcium carbonate cores // Наночастицы, наноструктурированные покрытия и микроконтейнеры: технология, свойства и области применения: матер. 5-ой междунар. конф. 9-12 Мая 2014 г. / Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2014.

Л7. Stetsyura I.Y., Markin A.V., Ponomarev A.N., Yakimansky A.V., Demina T.S., Grandfils C., Volodkin D.V., Gorin D.A. Microspheres coated with polymer/astralen layers and silver nanoparticles used as SERS platform // 8th International Symposium Molecular Order and Mobility in Polymer Systems: BOOK OF abstracts. June 2-6 2014 / St. Petersburg: IUPAC, 2014.

Л8. Стецюра И.Ю., Маркин А.В., Понамарев А.Н., Якиманский А.В., Grandfils C., Володкин Д.В., Горин Д.А. Платформы гигантского комбинационного рассеяния на основе микроструктур «ядро-оболочка», содержащих наночастицы астралена, и их применение для детектирования биологически активных молекул // Химия биологически активных веществ: Межвузовский сборник научных трудов Всероссийской школы-конференции молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием, Саратов, 24-28 сентября 2012 г. / отв.ред. О.В. Федотова. Саратов: Изд-во «КУБиК». 2012.

Л9. Stetsyura I.Y., Markin A.V., Ponomarev A.N., Yakimansky A.V., Gorin D.A. SERS Substrates Based on Core-Shell Structures Containing Astralen Nanoparticles //

Fundamentals and Applications of Nanoscience: Materials of German-Russian Conference, Berlin, May 19-21 2012 / Berlin: Freie Universitat, 2012.

Л10. Буланов М.С., Маляр И.В., Стецюра И.Ю., Федосеева М.В., Стецюра С.В. Локальная модификация свойств подложек на основе CdS-PbS посредством лазерного отжига // Нанoeлектроника, нанофотоника и нелинейная физика: тез. док. VII конф. молодых учен., 24–26 сентября 2012 г. / отв.ред. Е.П. Селезнев. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та. 2012.

Л11. Стецюра И.Ю., Маркин А.В., Пономарев А.Н., Якиманский А.В., Горин Д.А. Создание и тестирование гкрс-платформ на основе структур «ядро-оболочка» со встроенными наночастицами магнетита и нанокластерами углерода и их биомедицинское применение // Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине-2011: Материалы ежегод. Всерос. Науч. Школы-семинара, Саратов 25-27 октября 2011 г. / под ред. Д.А. Усанов. Саратов: Изд-во «Саратовский источник», 2011.

Л12. Stetsyura I.Y., Markin A.V., Ponomarev A.N., Yakimansky A.V., Gorin D.A. Preparation and testing of SERS substrates based on core-shell structures containing astralen nanoparticles // 2nd international school «Nanomaterials and nanotechnologies in living systems. Safety and nanomedicine, Moscow, 19 – 24 сентября 2011 г. / Lomonosov Moscow State University, 2011.

Л13. Стецюра И.Ю., Горин Д.А. Воздействие лазерного излучения на нанокompозитные микрокапсулы, содержащие в структуре оболочек углеродные нанотрубки // Научные исследования студентов СГУ: Материалы итог. студ. науч. конф., 14 мая 2009 г. / отв.ред. С.Г. Сучков. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2009.