

ХАНАДЕЕВ ВИТАЛИЙ АНДРЕЕВИЧ

**ОДНОЧАСТИЧНЫЕ И КОЛЛЕКТИВНЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА ЗОЛОТЫХ НАНООБОЛОЧЕК В СВЯЗИ С
БИОМЕДИЦИНСКИМИ ПРИМЕНЕНИЯМИ**

03.01.02 – биофизика

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата физико-математических наук

Саратов – 2010

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук, профессор
Хлебцов Николай Григорьевич

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, профессор
Максимова Ирина Леонидовна
доктор физико-математических наук, профессор
Мельников Леонид Аркадьевич

Ведущая организация:

Саратовский филиал
Института радиотехники и электроники РАН

Защита диссертации состоится “22” июня 2010 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета Д 212.243.05 при Саратовском государственном университете им. Н.Г. Чернышевского по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская 83, корп. 3, физический факультет СГУ, ауд. 34.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского

Автореферат разослан “19” мая 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук,
профессор



Дербов В. Л.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Золотые наночастицы и, в частности, золотые наноболочки на ядрах из двуокиси кремния [Л1] широко исследуются и применяются в современной нанобиотехнологии и биофотонике [Л2, Л3] благодаря развитым технологиям синтеза и функционализации их поверхности и уникальным оптическим свойствам, связанным с возбуждением одночастичных и коллективных плазмонных резонансов [Л4]. Плазмонный резонанс золотых наноболочек на ядрах из двуокиси кремния может быть настроен в области ближнего ИК от 700 до 1000 нм и, самое главное, имеется возможность контролировать соотношение между сечением поглощения и рассеяния. Эти важные свойства уже нашли интересные приложения в фототермолизе раковых клеток в экспериментах *in vivo* и *in vitro* [Л2], повышении контраста оптической томографии [Л5] и чувствительности иммуноанализа [Л6].

Следует также отметить, что с увеличением размера наноболочек в их спектрах экстинкции появляются мультипольные резонансы высших порядков, причем они, в отличие от золотых наностержней, наблюдаются в экспериментальных образцах, полученных с использованием оптимизированных нами протоколов синтеза. Кроме того, протоколы конъюгации золотых наноболочек с биополимерами качественно не отличаются от хорошо известных методик для наночастиц коллоидного золота.

Практически для всех приложений важно знать числовую концентрацию золотых наноболочек и все без исключения исследователи, использующие наши препараты, обязательно требуют эту информацию наряду с геометрическими параметрами и положением и интенсивностью пика экстинкции. Однако вплоть до 2008 г. такие оценки делались приближенно на основании материального баланса по ядрам из двуокиси кремния [Л7].

Оптические свойства невзаимодействующих оболочек достаточно просто моделируются обобщением теории Ми для концентрических сфер, однако для взаимодействующих наноболочек как теоретические, так и экспериментальные данные к моменту начала наших исследований отсутствовали. В 2003 г. Малинич и Чуманов [Л8] опубликовали интересное наблюдение о подавлении коллективной дипольной полосы в монослое серебряных сфер с диаметром частиц около 100 нм. При сближении частиц широкая дипольная полоса исчезала и оставался только острый пик вблизи квадрупольного резонанса индивидуальных частиц. Однако невыясненными оставались следующие вопросы: (1) Можно ли экспериментально наблюдать эффект [Л8] для других наночастиц, включая наноболочки? (2) Как зависит подавление коллективной дипольной моды от параметров частиц и структуры монослоя? (3) Каков физический механизм подавления коллективной дипольной полосы и как он связан с поглощением и рассеянием частиц?

Благодаря сильному рассеянию света в видимой области, золотые наноболочки являются отличными метками для темнопольной микроскопии. Однако в реальных экспериментах все оценки эффективности мечения проводились только на качественном уровне. Единственной известной нам работой, опубликованной в момент начала наших исследований, была статья [Л9], в которой количество связавшихся частиц оценивалось как разность между исходной концентрацией и концентрацией частиц в супернатанте инкубированных клеток, для чего использовалось измерение интенсивности углового рассеяния. Поскольку обычно доля связавшихся наноболочек невелика, точность этой непрямой методики не может быть высокой.

Таким образом, к моменту начала исследований, описанных в данной диссертации, имелся ряд нерешенных вопросов, связанных с оценкой концентрации золотых

нанооболочек в финальных препаратах многостадийного синтеза, с пониманием физических механизмов зависимости оптических свойств монослоев частиц с плазмонным резонансом от параметров самих частиц и плотности их упаковки. Наконец, отсутствовали данные о количественных методах оценки эффективности биоспецифического мечения клеток конъюгатами золотых нанооболочек или иных сильно рассеивающих металлических наночастиц, используемых в технологии темнопольной микроскопии. Этим определяется **актуальность и научная значимость** темы диссертации.

Целью диссертационной работы являлось развитие методов синтеза золотых нанооболочек на ядрах из двуокиси кремния и исследование их одночастичных и коллективных оптических свойств с целью оптимизации в таких применениях, как иммуноанализ, фототермолиз, биоимиджинг с использованием микроскопии резонансного рассеяния и оптической когерентной томографии.

Для достижения поставленной **цели** в работе решались следующие **задачи исследования**:

- Разработать оптическую методику определения среднего размера и концентрации золотых нанооболочек на основе спектротурбидиметрического анализа суспензий наночастиц двуокиси кремния, используемых в качестве ядер.
- Теоретически и экспериментально исследовать зависимость спектров экстинкции, рассеяния и поглощения плотноупакованных монослоев наночастиц различной природы с целью выяснения физических механизмов оптического взаимодействия в системах наночастиц с дипольным и квадрупольным плазмонным резонансом, а также их биосенсорную чувствительность в модельных экспериментах.
- Разработать алгоритм обработки темнопольных светомикроскопических изображений клеток, меченных резонансно рассеивающими конъюгатами нанооболочек, для получения количественной информации об эффективности мечения.
- Провести экспериментальное применение разработанного алгоритма на модели биоспецифического мечения клеток почек эмбриона свиньи.

Научная новизна работы:

- Разработан вариант иммерсионного метода определения показателя преломления наночастиц двуокиси кремния, синтезированных по методу Стёбера, с использованием данных спектротурбидиметрии и показано, что средний эффективный показатель преломления равен $n_{500} = 1.475 \pm 0.005$ [5]. Методами электронной и атомно-силовой микроскопии, спектротурбидиметрии и динамического светорассеяния впервые проведено комплексное исследование размера и концентрации наночастиц двуокиси кремния с целью разработки оптической методики оценки параметров золотых нанооболочек [1] (здесь и далее номера ссылок соответствуют списку работ по диссертации).
- Впервые проведено теоретическое исследование коллективных оптических свойств двумерных монослоев золотых и серебряных наносфер и нанооболочек с использованием точного многочастичного решения электродинамической задачи и выяснены основные закономерности подавления коллективной дипольной моды в плотноупакованном монослое [2].
- Впервые выполнено сравнение теоретических и экспериментальных спектров экстинкции монослоя золотых нанооболочек на кварцевой подложке и исследована

чувствительность коллективного плазмонного резонанса к диэлектрическому окружению [2, 3].

- Разработана новая процедура оценки эффективности мечения клеток ПР наночастицами и выполнена её экспериментальная проверка в темнопольном светомикроскопическом имиджинге непрямого биоспецифического мечения клеток почек эмбриона свиньи с использованием фаговых миниантител и конъюгатов золотых нанооболочек с антифаговыми антителами [6].

Научно-практическая значимость работы определяется возрастающими практическими применениями золотых нанооболочек в таких приложениях, как фототермолиз, иммуноанализ, количественный биоимиджинг и контрастирование изображений в оптической томографии. Для этих целей синтезируемые наночастицы используются в таких учреждениях, как ИБФРМ РАН, Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратовский государственный медицинский университет, Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина (г. Москва), Нижегородская медицинская академия и Институт прикладной физики РАН (г. Нижний Новгород), Институт кристаллографии РАН (г. Москва), ФГУП «ГНЦ НИОПИК» (г. Москва), ФИ РАН (г. Москва), ИПЛИТ РАН (г. Троицк).

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и их соответствием теоретическим расчетам, а также качественным и количественным согласием с результатами независимых исследований других авторов.

На защиту выносятся следующие основные положения и результаты:

1. Средний эффективный показатель преломления наночастиц двуокиси кремния диаметром 50-250 нм, синтезированных по методу Стёбера, равен $n_{500} = 1.475 \pm 0.005$. Спектротурбидиметрическая оценка среднего размера и концентрации наночастиц двуокиси кремния, получаемая с этим показателем преломления, находится в хорошем согласии с данными электронной микроскопии, динамического рассеяния света и материальным балансом.
2. Подавление дипольной полосы экстинкции является общим свойством плотноупакованных монослоев из плазмонно-резонансных частиц и наблюдается при среднем межчастичном расстоянии около 0.1-0.2 диаметра частиц в решеточных кластерах и при средней поверхностной плотности частиц порядка 0.25 в случайных монослоях. Кластеры с небольшим количеством частиц порядка 16-36 передают все основные спектральные свойства монослоя, показывая, что изменение спектра экстинкции определяется коллективным рассеянием, а спектр поглощения изменяется мало.
3. Экспериментальная зависимость длины волны коллективного квадрупольного резонанса монослоя на стеклянной подложке от показателя преломления внешней среды подчиняется универсальному линейному соотношению, первоначально выведенному для дипольного резонанса отдельных частиц и мультипольных резонансов золотых наностержней.
4. Разработанный метод оценки эффективности мечения клеток резонансно рассеивающими наночастицами позволяет достоверно отличить неспецифическое связывание от негативного контроля и в количественной форме оценить эффективность биоспецифического связывания конъюгатов с клетками.

Личный вклад диссертанта и результаты, полученные совместно с другими исследователями:

Личный вклад соискателя состоит в синтезе и исследовании оптических свойств золотых наноболочек и монослоев, в проведении расчетов и экспериментов, а также в разработке и экспериментальной апробации алгоритма обработки изображений с использованием пакета ImageJ для оценки эффективности мечения клеток.

Теоретические расчеты оптических свойств наночастиц, конъюгатов и кластеров выполнены совместно с д.ф.-м.н. Хлебцовым Н.Г. Оптимизация протоколов синтеза золотых наноболочек выполнена совместно с к.ф.-м.н. Хлебцовым Б.Н. Оптимизация протоколов функционализации наночастиц, эксперименты по адсорбции биополимеров на наночастицах коллоидного золота и интерпретация данных выполнены совместно с д.б.н. Дыкманом Л.А., д.б.н. Богатыревым В.А. Эксперименты по разработке метода оценки эффективности мечения клеток конъюгатами были выполнены совместно с д.б.н. Староверовым С.А., асп. Скапцовым А.А., и студенткой 5-го курса Иленевой Е.С.

Часть электронно-микроскопических исследований выполнена совместно с к.б.н. Бурыгиным Г.Л. Эксперименты по самоассемблированию монослоев золотых наночастиц и наноболочек выполнены совместно с к.ф.-м.н. Б. Н. Хлебцовым, Dr. J. Ye и Prof. G. Borghs на базе Межуниверситетского центра микроэлектроники (IMEC, Leuven, Бельгия) в рамках гранта INTAS.

Работа выполнена на базовой кафедре биофизики факультета нелинейных процессов Саратовского госуниверситета им. Н.Г. Чернышевского.

Гранты.

Исследования поддерживались 4 грантами РФФИ (2007-2010 годы); государственным контрактом на проведение научно-исследовательской работы № 02.513.11.3043; Программой президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине»; грантом Президента РФ МК-684.2009.2 (соисполнитель), федеральными целевыми программами «Развитие научного потенциала высшей школы», контракт № 2.2.1.1/2950 и «Научные и педагогические кадры инновационной России», контракт № 02.740.11.0484, а также двумя государственными персональными контрактами по программе «У.М.Н.И.К.» (2008-2010, руководитель гранта).

Апробация результатов:

Основные результаты диссертации представлялись автором на следующих научных конференциях:

- Saratov Fall Meeting – International School for Young Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophysics, Saratov, Russia, 2007-2009 (два устных доклада)
- Школа –конференция «Нелинейные дни в Саратове для молодых - 2007»
- 10th Russian-German-Ukrainian Analytical Symposium, 2007, Saratov, Russia
- 1-ый и 2-ой Международный форум по нанотехнологиям, 2008 и 2009, Москва, Россия
- Конференция с межд. участием «Нанотехнологии в онкологии», Москва, 2009 (устный доклад)

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 статей и 5 тезисов докладов, включая 6 статей из перечня, рекомендованного ВАК для публикации результатов кандидатских диссертаций.

Структура и объём работы

Диссертация состоит из введения, основной части, содержащей 4 главы, заключения и списка цитируемой литературы, состоящего из 263 ссылок. Диссертация изложена на 154 страницах, содержит 2 таблицы и 35 рисунков.

Краткое содержание работы

Во **Введении** обоснована актуальность темы работы и её научно-практическое значение, представлены объекты и методы исследования.

В **Главе 1** приведен аналитический обзор литературы по теме диссертации. Рассмотрены основные методы синтеза и исследования плазмонно-резонансных наночастиц, включая частицы КЗ, золотые наностержни и наноболочки. Обсуждаются оптические свойства металлических наночастиц, диэлектрические функции наноразмерных образцов, приближенные и строгие методики моделирования спектров экстинкции и рассеяния наночастиц. Рассмотрены принципы функционализации металлических наночастиц биомакромолекулами и основные направления биофизических и биомедицинских применений наноболочек.

Глава 2 посвящена разработке методики определения среднего размера и концентрации золотых наноболочек на основе измерения спектров экстинкции суспензий наночастиц двуокиси кремния, используемых в качестве ядер. Протокол синтеза золотых наноболочек состоит из двух этапов. На первом этапе получают ядра - наночастицы двуокиси кремния, а затем их поверхность покрывают золотой оболочкой необходимой толщины. Поэтому именно размер и концентрация наночастиц двуокиси кремния, полученных на первом этапе синтеза, определяют общий размер и концентрацию наноболочек в полученных препаратах. Для определения концентрации силикатных частиц необходимо знать их показатель преломления, который, вообще говоря, зависит от технологии синтеза. Поэтому первой задачей работы было определение этого параметра с использованием модифицированного варианта иммерсионного метода.

В случае разбавленной суспензии маленьких (диаметр $d \leq \lambda/2$) наночастиц справедливо следующее соотношение [Л10] для оптической плотности A :

$$A \sim C_{sca} \sim x^w \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \right)^2 \sim \varepsilon_m^{w/2} \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \right)^2, \quad (1)$$

где $\varepsilon = n^2$ и $\varepsilon_m = n_m^2$ - диэлектрические проницаемости частиц и дисперсионной среды соответственно, $x = \pi d \sqrt{\varepsilon_m} / \lambda$ есть параметр размера d , w есть волновой экспонент, определяющий спектральную степенную зависимость оптической плотности на ограниченном диапазоне длин волн [Л10] $A \sim \lambda^{-w}$. Из соотношения (1) легко видеть, что отношение оптических плотностей $A(\varepsilon_m) / A(\varepsilon_{m0}) \equiv A(n_m) / A(n_{m0})$ для двух иммерсионных сред будет зависеть от диэлектрической проницаемости или показателя преломления наночастиц. Таким образом, вычисляя отношения оптических плотностей как функцию $n_m = \sqrt{\varepsilon_m}$ для различных показателей преломления частиц $n = \sqrt{\varepsilon}$ и сравнивая затем значения с экспериментально измеренными отношениями оптических плотностей, можно найти показатель преломления частиц. Второй вариант определения показателя преломления наночастиц базируется на модифицированном уравнении (1), которое может быть переписано в виде:

$$\sqrt{A(\bar{\lambda})} / \varepsilon_m^{w/4} \sim \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m} \right). \quad (2)$$

Для реализации этого метода необходимо измерить волновой экспонент и оптическую плотность суспензии на определенной длине волны $\bar{\lambda}$ (например, $\bar{\lambda} = 500$ нм) в иммерсионных средах с различным показателем преломления и построить зависимость $\sqrt{A(\bar{\lambda})} / \varepsilon_m^{w/4}$ от диэлектрической проницаемости иммерсионной среды ε_m . Экстраполируя эту зависимость до пересечения с осью абсцисс, можно найти диэлектрическую проницаемость частиц и, соответственно, показатель преломления наночастиц.

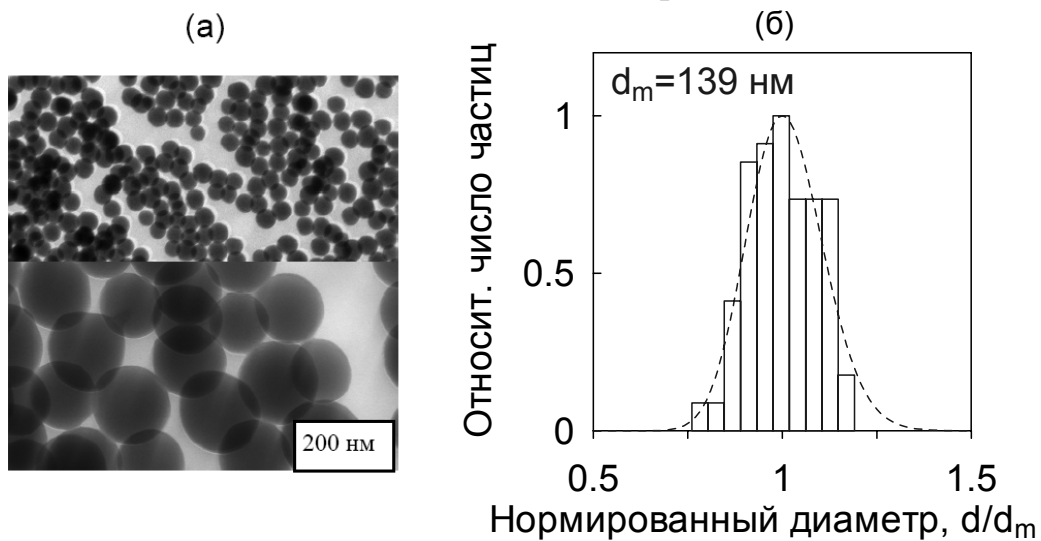


Рис. 1. ТЭМ фотографии частиц двуокиси кремния со средним диаметром 139 нм (а) и ТЭМ распределение частиц по размерам (б). Штриховая кривая показывает аппроксимацию гистограммы гамма-распределением с параметром полидисперсности $\mu = 100$ (ширина распределения $\Delta d = 2.48d_m / \sqrt{\mu}$).

В экспериментах использовали следующие реагенты: тетраэтилортосиликат (ТЭОС), диметилсульфоксид (ДМСО), 25% водный раствор аммиака и абсолютный этанол, полистирольные латексные стандарты размером 100 нм (Metachem Diagnostics, Ltd., UK). Для синтеза силикатных наночастиц со средним диаметром 100 нм, 0.62 мл 25% аммиака было добавлено к 10 мл абсолютного этанола на магнитной мешалке (500 об/мин) при комнатной температуре. Через 5 минут 0.3 мл ТЭОС добавлялось по каплям, суспензия перемешивалась в течение 1 часа и затем выдерживалась при комнатной температуре без перемешивания 12 часов. Для получения частиц других размеров (от 80 до 250 нм) варьировалось количество добавляемого аммиака (от 0.6 до 0.78 мл). Измерения методом динамического рассеяния света (ДРС) проводилось на установке Photocor FC-2 (PhotoCor Inc., Россия). Электронно-микроскопические фотографии (ЭМ) получали с использованием микроскопа Libra-120 (Carl Zeiss, Германия). Атомно-силовую микроскопию (АСМ) проводили на микроскопе Solver Bio AFM (NT-MDT, Россия). Измерения показателя преломления были сделаны с использованием рефрактометра ИРФ-23 (ЛОМО, Россия; точность измерения 0.0005). Спектры оптической плотности были измерены на спектрофотометре Specord BS-250 (Analytik Jena, Германия) и Specord M-40 (Carl Zeiss, Германия). Для примера на рис. 1 приведены ТЭМ фотографии одного из образцов и ТЭМ распределение по размерам (полуширина распределения около 12 %).

На рис. 2 приведен пример определения показателя преломления наночастиц по второму варианту иммерсионного метода. Усреднив экспериментальные данные для обоих методов, нашли средний показатель преломления наночастиц оксида кремния $\langle n \rangle = 1.475 \pm 0.005$. Хотя это значение близко к известному показателю преломления оксида кремния в аморфном состоянии $n = 1.46$ (данные литературы варьируют от 1.6 до 1.45), но

даже эта небольшая разница будет существенно влиять на коэффициент экстинкции частицы в этаноле (примерно на 25%) и, соответственно, на рассчитываемую концентрацию частиц.

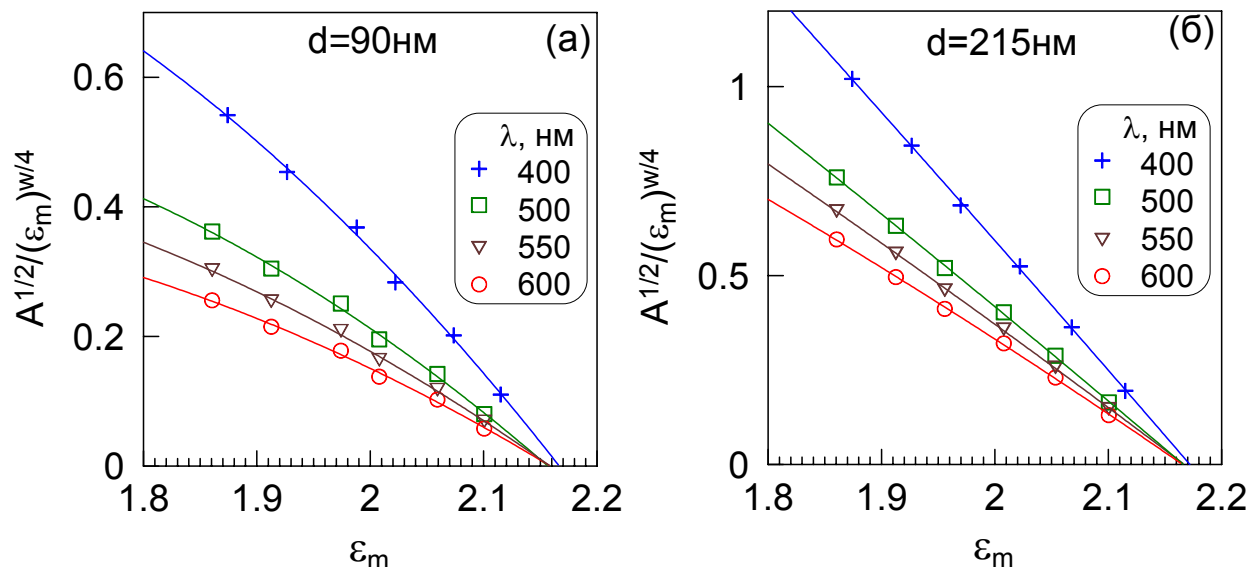


Рис. 2. Графики зависимости $\sqrt{A}/\varepsilon_m^{w/4}$ от ε_m для силикатных наночастиц с диаметром 90 нм (а) и 215 нм (б) в 6 иммерсионных средах с показателями преломления от 1.362 до 1.455. Среднее значение, полученное путем экстраполяции равно $n = \sqrt{\varepsilon} = 1.472 \pm 0.005$. В качестве иммерсионной среды использовались смеси этанола и ДМСО с различным процентным соотношением компонентов (от 0 до 80 объемных процентов ДМСО).

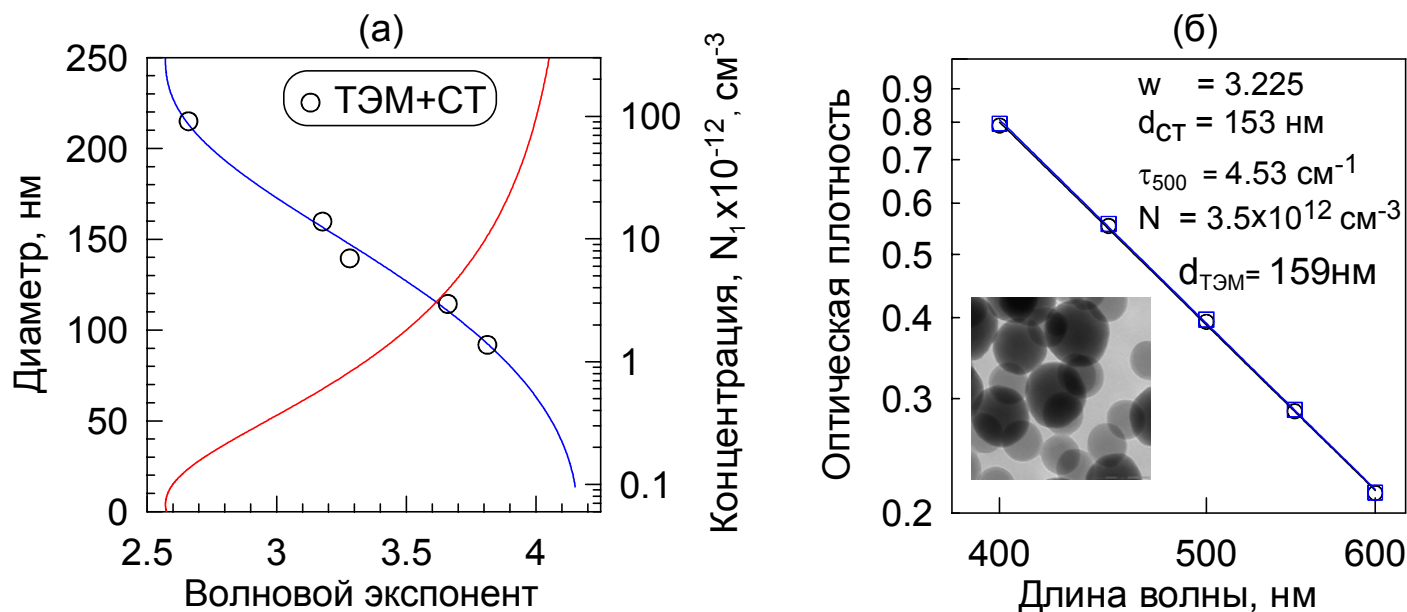


Рис. 3. (а) – Калибровочные графики для определения среднего размера и концентрации N_l при $\bar{\tau} = 1 \text{ см}^{-1}$ для силикатных частиц в этаноле. Кружочками показаны экспериментальные значения диаметра (ТЭМ) и волнового экспонента (СТ). (б) – Пример спектрофотометрической характеристики 160-нм наночастиц. На вставке показаны параметры частиц, полученные из данных СТ, а также ТЭМ изображение 160-нм оксида кремния (большие частицы) вместе со стандартным 100-нм полистирольным латексом (Metachem Diagnostics, Ltd., UK; маленькие частицы).

На рис. 3а представлен основной теоретический результат данной главы в виде

калибровочных графиков, которые можно использовать для определения среднего размера и концентрации полидисперсных силикатных наночастиц в этаноле непосредственно по спектральным измерениям. Точность калибровки иллюстрируется результатами для 5 экспериментальных образцов, исследованных совместно методами электронной микроскопии (ТЭМ) и спектротурбидиметрии (СТ). Справа приведен пример СТ характеристики 160 нм силикатных наночастиц (диаметр по данным ТЭМ). Данные СТ измерений и расчетов приведены на рисунке. На вставке показано ТЭМ изображение 160-нм силикатных частиц и метрологического стандарта – частиц полистирольного латекса диаметром 100 нм, добавленного прямо в суспензию силикатных наносфер.

Таблица 1. Результаты определения размера и концентрации наночастиц оксида кремния методами электронной микроскопии (ТЭМ), динамического рассеяния (ДРС), атомно-силовой микроскопии (АСМ) и спектротурбидиметрии (СТ).

Номер образца	Диаметр ТЭМ, нм	Диаметр ДРС, АСМ, нм	Волновой экспонент	Удельная мутность, см ⁻¹	Диаметр СТ, нм	Числовая концентрация* $N \times 10^{-12}$, см ⁻³	Массовая концентрация*, мг/см ³
1	92±8	86±15 95±13	3.813	1.3	94±7	9.8±2	6.9±0.6
2	114±12	108±24 133±15	3.660	2.2	112±6	6.1±1	7.4±0.4
3	-	-	3.700	1.9	107±6	6.6±1.5	7.1±0.4
4	-	-	3.753	1.4	101±7	6.8±2	6.0±0.4
5	-	-	3.743	1.8	103±7	8.2±2	7.5±0.4
6	119±15	125±35	3.550	2.6	122±5	4.3±1	6.9±0.4
7	139±12	138±47 150±13	3.282	3.4	148±5	2.1±0.4	6.0±0.3
8	-	-	3.225	4.4	153±5	2.3±0.4	7.3±0.3
9	160±17	143±58 162±12	3.177	4.5	157±5	2.0±0.4	7.1±0.3
10	217±20	216±100	2.635	10.1	220±10	0.6±0.12	7.2±0.3

*При расчете ошибок использована средняя экспериментальная ошибка волнового экспонента ±0.05

Обобщение результатов определения концентрации и размера частиц для 10 образцов приведено в Таблице 1. Видно хорошее согласие спектрофотометрического метода с результатами независимых методик (ТЭМ, АСМ, ДРС). Также следует отметить, что СТ массовая концентрация, определенная по числовой концентрации частиц и плотности 2 г/см³, хотя и близка к значению 7.3 мг/мл, полученному из материального баланса и предположения о полном восстановлении ТЭОС в ходе реакции, в ряде случаев заметно отличается от данных материального баланса.

Глава 3 посвящена теоретическому и экспериментальному исследованию спектров экстинкции, рассеяния и поглощения плотноупакованных монослоев наночастиц различной природы с целью выяснения физических механизмов оптического взаимодействия в системах наночастиц с дипольным и квадрупольным плазмонным резонансом.

Теоретический анализ

В работе моделировали оптические свойства монослоев, образованных пятью типами частиц: (1) серебряные наносферы с диаметром d_{Ag} ; (2) золотые нанооболочки с ядром из двуоксида кремния d_{SiO_2} и внешним диаметром d_{Au} ; (3) серебряные нанооболочки с ядром

из двуокиси кремния d_{SiO_2} и внешним диаметром d_{Ag} ; (4) и (5) золотые и серебряные нанооболочки с ядром из полистирола вместо двуокиси кремния. В качестве простейшей модели монослоя использовали квадратную решетку с периодом $p = d(1 + s)$, где d есть внешний диаметр частицы, а s есть относительное межчастичное расстояние. Вторая модель получалась случайным заполнением квадрата со стороной L/d заданным числом частиц N . Относительные координаты частиц X_i трансформировались затем по закону $x_i = X_i d(1 + s)$, где параметр s контролирует минимальное межчастичное расстояние. Структура получаемого монослоя характеризуется числом частиц N и их средней плотностью $\rho = NS_{geom} / [L^2(1 + s)^2]$.

Для расчета оптических свойств монослоя с учетом подложки рассматривался двумерный массив из N сфер или нанооболочек на диэлектрической поверхности с диэлектрической функцией ε_s , которая расположена на уровне $z = 0$. Над диэлектрической поверхностью находится полубесконечная диэлектрическая среда с диэлектрической функцией ε_m (в положительном направлении оси z , см. рис. 4).

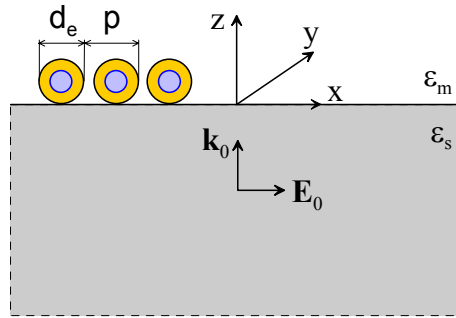


Рис. 4. Система координат для строгого решения задачи о кластере частиц на подложке в виде полубесконечного слоя. Падающий свет распространяется в положительном направлении оси z от полубесконечного слоя с диэлектрической функцией ε_s к полубесконечной однородной среде (ε_m), окружающей двухслойные частицы, образующие двумерный кластер (по данным работы [2]).

Строгое решение для кластера, расположенного на поверхности было получено D. Maskowski (Auburn Univ., USA) в работе [Л11] и использовалось в нашей совместной публикации [2]. Кратко, суть решения состоит в следующем. Полное поле $\mathbf{E}_{exc}^i$, возбуждающее i -ую частицу кластера представляется как сумма полей прямой ($\mathbf{E}_{0,d}^i$) и отраженной ($\mathbf{E}_{0,r}^i$) падающих плоских волн, а также прямых волн $\mathbf{E}_{sca,d}^j$, рассеянных в направлении данной частицы всеми $N-1$ сферами вместе с полями рассеянных волн, отраженными от поверхности $\mathbf{E}_{sca,r}^j$:

$$\mathbf{E}_{exc}^i = \mathbf{E}_{0,d}^i + \mathbf{E}_{0,r}^i + \sum_{j=1}^N \left[(1 - \delta_{ij}) \mathbf{E}_{sca,d}^j + \mathbf{E}_{sca,r}^j \right]. \quad (3)$$

Падающие прямое ($\mathbf{E}_{0,d}^i$) и отраженное ($\mathbf{E}_{0,r}^i$) поля могут быть представлены в виде разложения по векторным сферическим гармоникам (ВСГ) первого рода, с коэффициентами разложения p_ν и g_ν , соответственно. Рассеянные прямое и отраженное поля представляются разложениями с использованием ВСГ третьего рода $\mathbf{Y}_\nu^{(3)}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_j)$ относительно центра каждой сферы. Применение теорем трансляции ВСГ для рассеянного и отраженного полей с учетом граничных условий приводит к следующим уравнениям для коэффициентов взаимодействия a_μ^i [3] ($\bar{a}_\mu^i$ суть коэффициенты Ми изолированных частиц):

$$\frac{1}{\bar{a}_\mu^i} a_\mu^i - \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^N \sum_{\mu} H_{\nu\mu}^{ij} a_\mu^j - \sum_{j=1}^N \sum_{\mu} R_{\nu\mu}^{ij} a_\mu^j = p_\nu^i + g_\nu^i, \quad (4)$$

где $\nu, \mu = (n, m, p)$ есть мультииндексы, учитывающие порядок n , моду $|m| \leq n$ и четность ВСГ, $R_{\nu\mu}^{ij}$ - матрица трансформации, которая даёт регулярное (конечное в нуле) выражение ВСГ (относительно источника $\mathbf{r}_i$), полученное через отражение исходящих ВСГ с центром в $\mathbf{r}_j$. После численного решения весьма сложного уравнения (4), сечения поглощения и рассеяния сфер в кластере и рассеяние в дальней зоне могут быть рассчитаны достаточно просто, как описано в [3]. Например, для сечения экстинкции имеем [3]

$$C_{ext} = \frac{4\pi}{k^2} \sum_{i=1}^N \sum_{n=1}^M \sum_{m=-n}^n \sum_{p=1}^2 \text{Re}[a_{mnp}^i (p_{mnp}^i)^*]. \quad (5)$$

В работе [2] мы показали, для случая кварцевой подложки в воде спектры экстинкции кластеров наночастиц с плазмонным резонансом можно рассчитывать без учета подложки, что существенно упростило дальнейший анализ.

Межчастичное расстояние является важнейшим параметром, определяющим электродинамическое взаимодействие частиц и коллективные спектральные свойства ансамбля. На рис. 5а показано, как изменяется спектр экстинкции решеточного кластера 4x4 из наноболочек SiO_2/Au с диаметром ядра 160 нм и толщиной слоя золота 20 нм при уменьшении параметра s от 1 до 0.1. Начиная со значений параметра s около 0.2 наблюдается эффективное подавление дипольной моды, так что резонанс определяется только квадрупольной модой на длине волны около 610 нм. Уменьшение параметра s в два раза (до 0.1) мало изменяет спектр системы. Эти выводы носят общий характер и мало зависят от свойств самих частиц (см. рис. 5б) Этот вывод также справедлив и для серебряных частиц и наноболочек (данные не представлены).

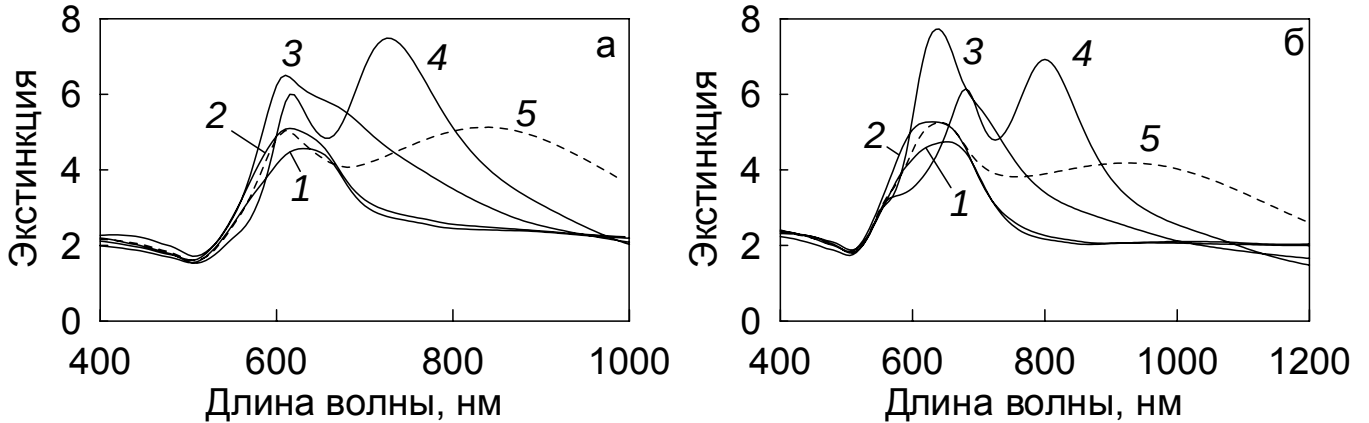


Рис. 5. Спектры экстинкции решеточных 4x4 кластеров, построенных из наноболочек типа SiO_2/Au с размерами 160/20 нм (а) и 190/25 нм (б). Параметр относительного межчастичного расстояния равен 0.1 (1), 0.2 (2), 0.6 (3) и 1 (4). Штриховая кривая (5) показывает одночастичный спектр.

На рис. 6 приведены спектры экстинкции решеточных и случайных кластеров с числом частиц 16 и 36. Параметр межчастичных расстояний для случайного кластера фиксирован и равен 0.1. Соответствующие средние плотности частиц равны 0.415 и 0.36 для кластеров из 16 и 36 частиц, соответственно. Для решеточных кластеров параметр s рассматривался как подгоночный параметр, который дает хорошее согласие спектров. Видно, что в обоих случаях спектры решеточных кластеров с параметром $s=0.2$ и случайных кластеров оказываются весьма близкими. Более близкое согласие спектров для 36-частичных кластеров получается, если выбрать параметр $s=0.35$ для решеточного

случая. Таким образом, мы приходим к выводу, что тонкие детали структуры кластера (решеточный или случайный) играют гораздо меньшую роль, чем среднее межчастичное расстояние и средняя плотность частиц.

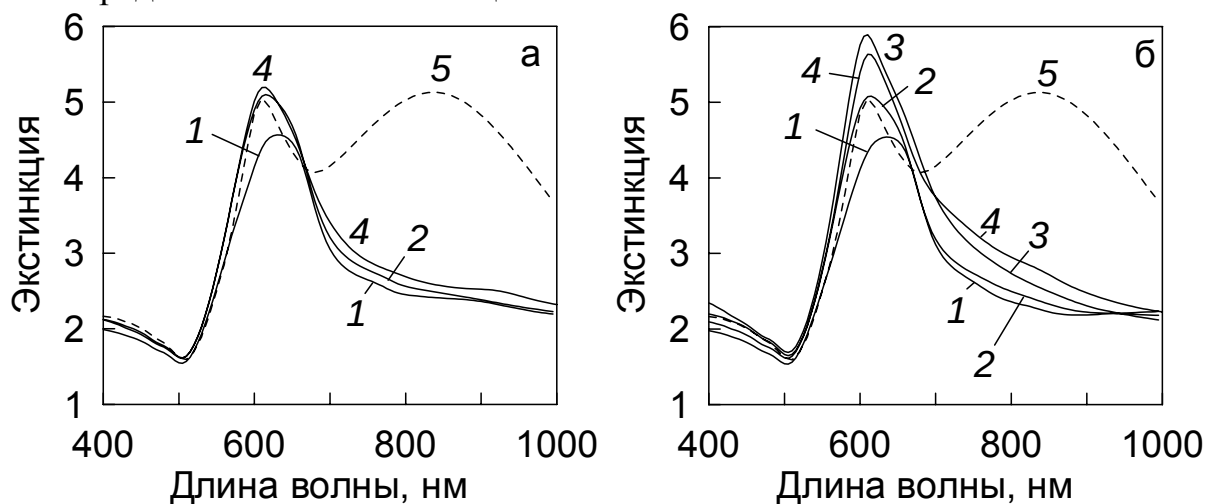


Рис. 6. Спектры экстинкции решеточных (1-3) и случайных (4) кластеров из наноболочек SiO_2/Au (160/20 нм) с числом частиц 16 (а) и 36 (б). Показаны также спектры отдельных частиц (5). Параметр межчастичных расстояний равен 0.1 (1), 0.2 (2) и 0.35 (3) для решеточных кластеров и 0.1 (4) для случайных кластеров. Средняя плотность частиц случайных кластеров равна 0.415 (а) и 0.36 (б) для 16 и 36 частиц соответственно.

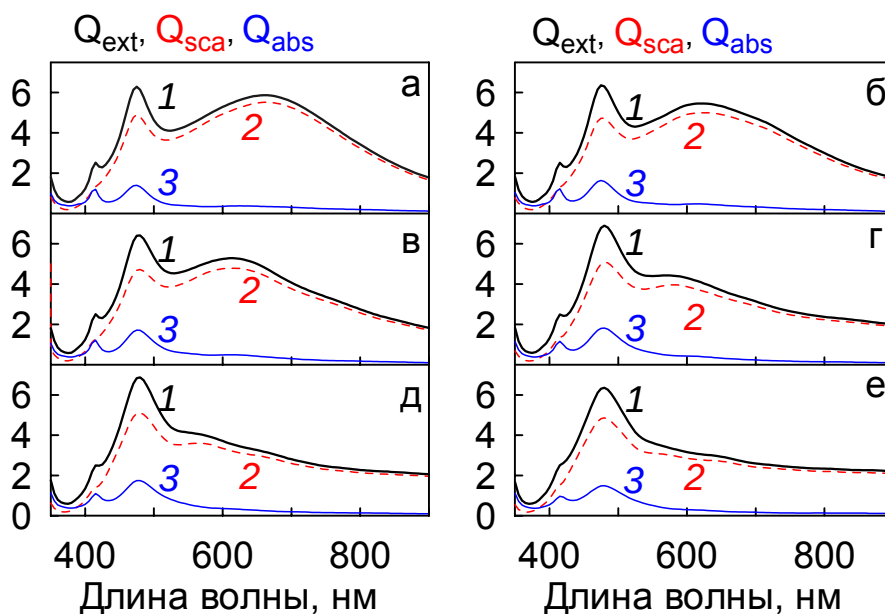


Рис. 7. Спектры экстинкции (1), рассеяния (2) и поглощения (3) случайных кластеров из 36 серебряных наноболочек типа PS/Ag (диаметр полистирольного ядра 110 нм, толщина серебряной оболочки 20 нм). Параметр минимального расстояния равен $s=0.05$, средняя плотность соответствует одной частице (а), 0.06 (б), 0.12 (в), 0.25 (г), 0.35 (д) и 0.4 (е). Результаты расчетов усреднены по пяти статистическим реализациям

Рисунок 7 показывает зависимость спектров экстинкции, рассеяния и поглощения от средней плотности случайных кластеров типа PS/Ag (диаметр полистирольного ядра 110 нм, толщина серебряной оболочки 20 нм). Результаты расчетов усреднены по пяти независимым компьютерным генерациям кластеров. Как видно из рисунка, при увеличении плотности частиц до 0.25 дипольная полоса экстинкции исчезает и остается только квадрупольный пик. Рассмотрим теперь отдельно спектры поглощения и рассеяния. Мы видим, что четкие квадрупольный и октупольный пики поглощения в коротковолновой части спектра практически не зависят от средней плотности частиц в монослое, а

исчезновение дипольной полосы экстинкции связано с подавлением доминирующей полосы дипольного рассеяния. Тонкая структура спектра экстинкции в коротковолновой части обусловлена мультипольными коллективными резонансами поглощения. С увеличением плотности частиц структура коротковолновой части спектра поглощения не претерпевает сильных изменений. Напротив, спектр рассеяния трансформируется радикально, показывая подавление дипольного резонанса рассеяния.

Таким образом, мы приходим к принципиальному выводу о том, что обнаруженный в [Л8] эффект подавления дипольной полосы экстинкции в монослое целиком обусловлен уменьшением резонансного дипольного рассеяния при сближении сильно рассеивающих частиц с дипольным и квадрупольным резонансами. Электродинамическое взаимодействие частиц практически не изменяет спектра поглощения.

Эксперимент

Нанооболочки были синтезированы путем восстановления HAuCl_4 на золотых «зародышах», адсорбированных на поверхности силикатных наночастиц, по методу [Л2] с минимальными модификациями, касающимися концентраций реагентов. Сканирующие электронно-микроскопические изображения были получены на микроскопе Philips XL30 FEG при ускоряющих напряжениях 5-10 кВ (эти эксперименты были выполнены в Межуниверситетском Центре Микроэлектроники, г. Лёвен, Бельгия). Атомно-силовые изображения были получены с помощью микроскопа Solver BIO (NT-MDT, Россия). UV-VIS-NIR спектры были измерены с помощью спектрофотометров Specord M-40 (Carl Zeiss, Jena) и Shimadzu UV-1601PC (Япония). Измерения методом динамического рассеяния света были выполнены с помощью приборов Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) и Photocor FC-2 (Photocor Instruments, Россия). Для получения темнопольных изображений использовали оптический микроскоп Leica D2500 со специальной приставкой для получения изображений в темном поле, позволяющей осуществлять боковое освещение. Использовали также микроскоп Биолам М (ЛОМО, Россия) со специальным конденсором темного поля.

На рис. 8 показаны темнопольные изображения золотых нанооболочек, адсорбированных на функционализированном стекле из суспензии за различные времена инкубации. Визуально наблюдаемая интенсивность резонансного рассеяния в красной области спектра позволяет легко контролировать изменение плотности частиц в формируемом монослое (см. также рис. 9).

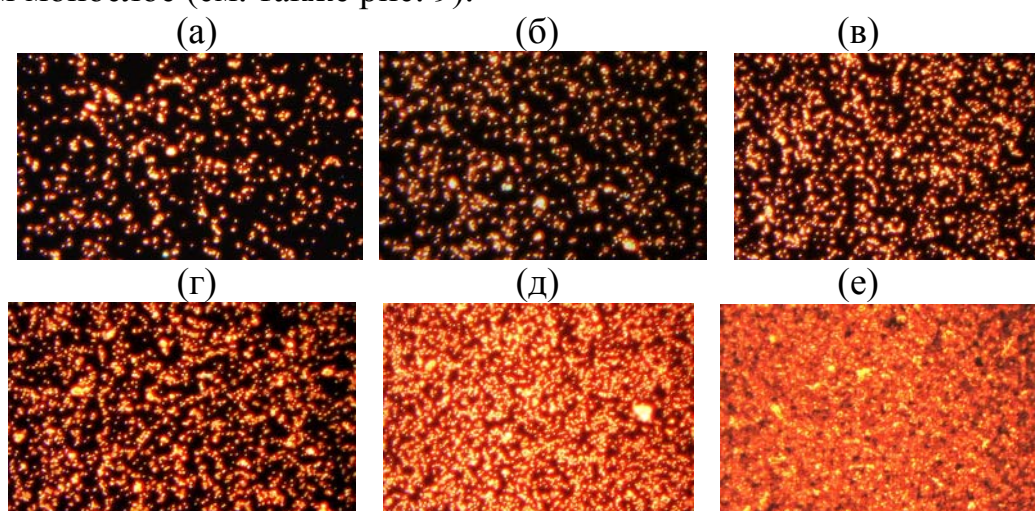


Рис. 8. Темнопольное микроскопическое изображение золотых нанооболочек, адсорбированных на стекле за время инкубации 10 (а), 15 (б), 20 (в), 30 (г), 60 (д) мин и 12 часов (е).

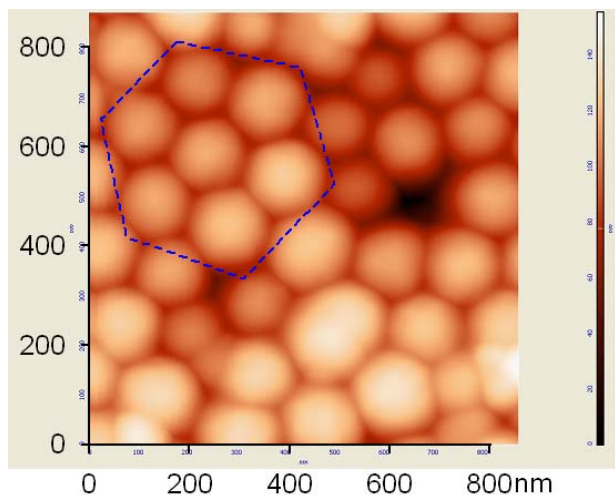


Рис. 9. Атомно-силовое изображение участка монослоя с плотным заполнением частиц после 12 часов инкубации. Видна многослойная структура сформированного кластера частиц и выделен участок гексагональной упаковки.

На рис. 10а показаны теоретические и экспериментальные спектры отдельных частиц (разбавленная суспензия). Теоретический спектр отличается от экспериментального прежде всего большей глубиной минимума между квадрупольной и дипольной полосой. Очевидно,

что это различие связано с несовершенством модели монодисперсной суспензии идеальных двухслойных частиц. На рис. 10б приведены экспериментальный и теоретический спектры монослоя золотых наноболочек с размерами 160/17 нм. Теоретическая модель соответствует случайным кластерам из 36 частиц со средней плотностью 0.25 (спектры усреднены по пяти реализациям). Учитывая множество факторов, не учтенных в теоретической модели, согласие между расчетами и измерениями можно признать вполне удовлетворительным. Во всяком случае, как теоретические, так и экспериментальные спектры монослоя демонстрируют эффективное подавление длинноволновой дипольной полосы рассеяния.

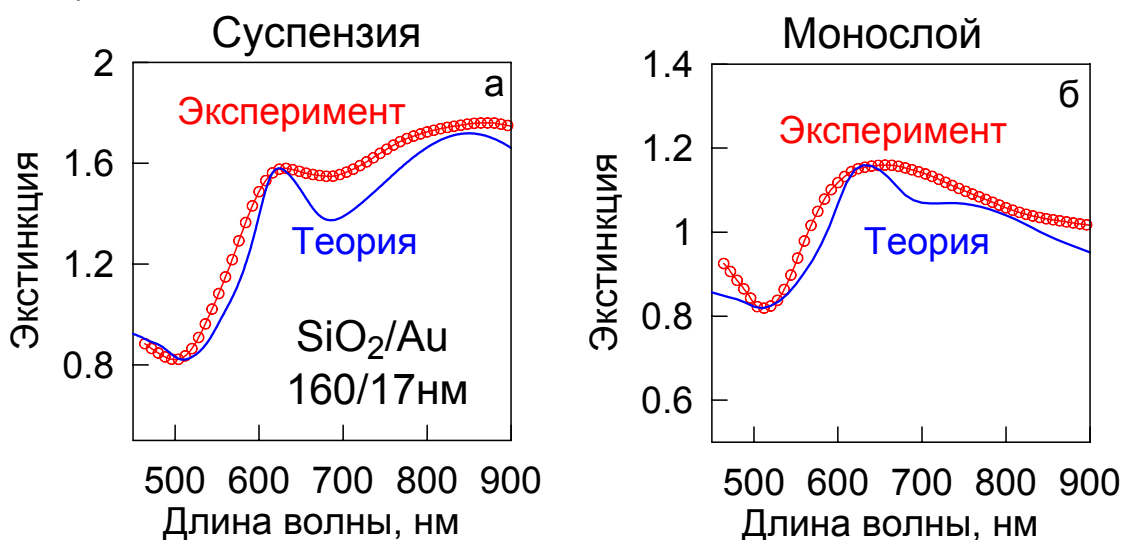


Рис. 10. Экспериментальные и теоретические нормированные спектры экстинкции суспензии золотых наноболочек (а) и монослоя (б). Толщина оболочек (17 нм) подобрана из лучшего соответствия спектров суспензий и близка к экспериментальной.

Мы также синтезировали золотые наноболочки со средним диаметром ядра 200 ± 10 нм и внешним диаметром 242 ± 12 нм (ТЭМ). Средний диаметр ядра по данным ДРС был около 212 ± 5 нм, что соответствует толщине золотой оболочки около 15-20 нм. Для краткости, этот образец обозначали 200/20. В расчетах диаметр ядра и толщина оболочки варьировались около измеренных ТЭМ и ДРС значений для получения наилучшего согласия с экспериментально измеренными спектрами. При таком подходе была выбрана теоретическая модель с диаметром ядра около 230 нм и толщиной оболочки около 15 нм.

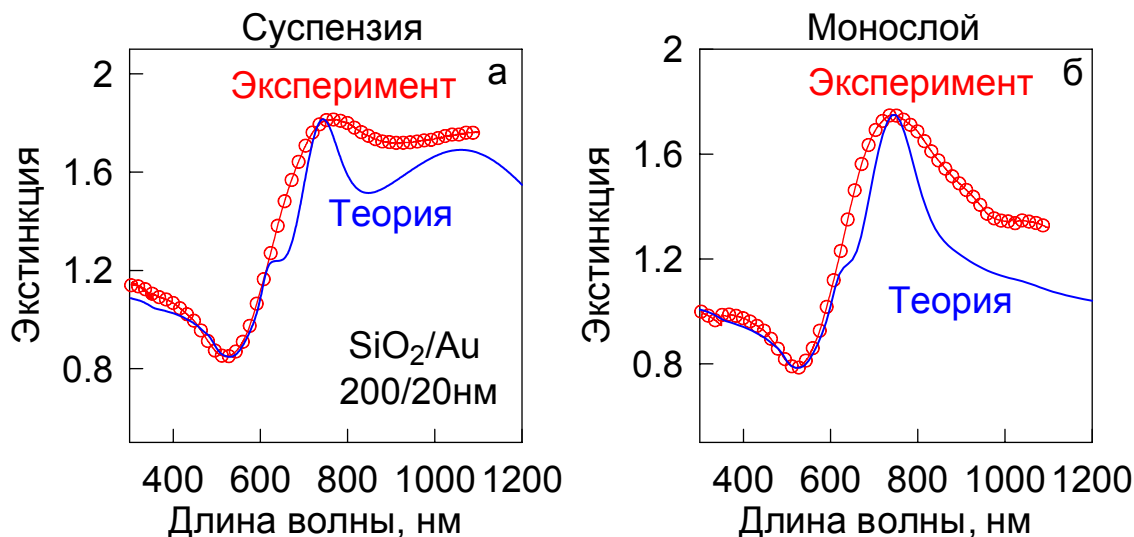


Рис. 11. Экспериментальные и теоретические спектры экстинкции для суспензии (а) и монослоя (б) наноболочек (200/20 по данным ТЭМ) в воде. Рассчитанный спектр монослоя был усреднён по пяти независимым случайным двумерным массивам из 36 частиц со средней плотностью частиц $\rho = 0.25$ (с параметром s около 0.05).

Расчеты спектров рассеяния и поглощения по отдельности показали, что октупольный пик появляется преимущественно благодаря вкладу поглощения, квадрупольный пик возникает из-за вкладов рассеяния и поглощения, а дипольный пик обусловлен в основном вкладом рассеяния. Взаимодействие между частицами в экспериментально сформированном монослое приводит к значительному снижению плеча экстинкции в области 800-1100 нм из-за подавления резонансного рассеяния. Для моделирования спектра монослоя мы использовали подгоночные средний диаметр ядра и толщину оболочки (230 и 15 нм) и пять независимых расчетов для случайных монослоев из 36 частиц со средней плотностью частиц $\rho = 0.25$ (с параметром s около 0.05). В целом, расчеты для модели хорошо согласуются с измеренными спектрами.

Сравнивая полученные данные с наблюдениями Халас с соавт. [Л12] можно отметить, что в отличие от наших спектров (Рис. 10, 11), эти авторы наблюдали 2 отдельных полосы: узкую полосу в видимой (или ИК) области, соответствующую квадрупольному резонансу отдельных наноболочек и новую широкую полосу, начинающуюся в ближней и заканчивающуюся в средней ИК области спектра. В диссертации эти отличия объясняются отличием в структуре монослоев и прямым омическим контактом частиц в [Л12].

Зависимость плазмонного резонанса монослоя от показателя преломления внешней среды

В данном разделе представлены экспериментальные результаты для монослоя золотых наноболочек, помещенного в среды с различным показателем преломления. В качестве таковых мы использовали воздух, воду, этиловый спирт, гексан, четыреххлористый углерод и растворы м-крезола с концентрацией от 0 до 80 % по весу. Диаметр ядра 190 нм и толщина золотой оболочки 24 нм были получены методом ДРС. Ранее было показано [Л3], что относительный сдвиг плазмонного резонанса индивидуальных частиц $\Delta\lambda_p / \lambda_p$ связан с инкрементом показателя преломления внешней среды $\Delta n_m / n_m$ простым линейным соотношением $\Delta\lambda_p / \lambda_p = \text{const} * \Delta n_m / n_m$. На рис. 12 представлены теоретические и экспериментальные данные для зависимости длины волны квадрупольного резонанса λ_q от показателя преломления внешней среды n_m (рис. 12а) и для зависимости $\Delta\lambda_q / \lambda_q$ от $\Delta n_m / n_m$ (рис. 12б). Таким образом, эти данные иллюстрируют выполнение линейного соотношения не только для дипольного или мультипольных резонансов индивидуальных частиц (для которых оно было получено), но и для коллективного квадрупольного резонанса монослоя.

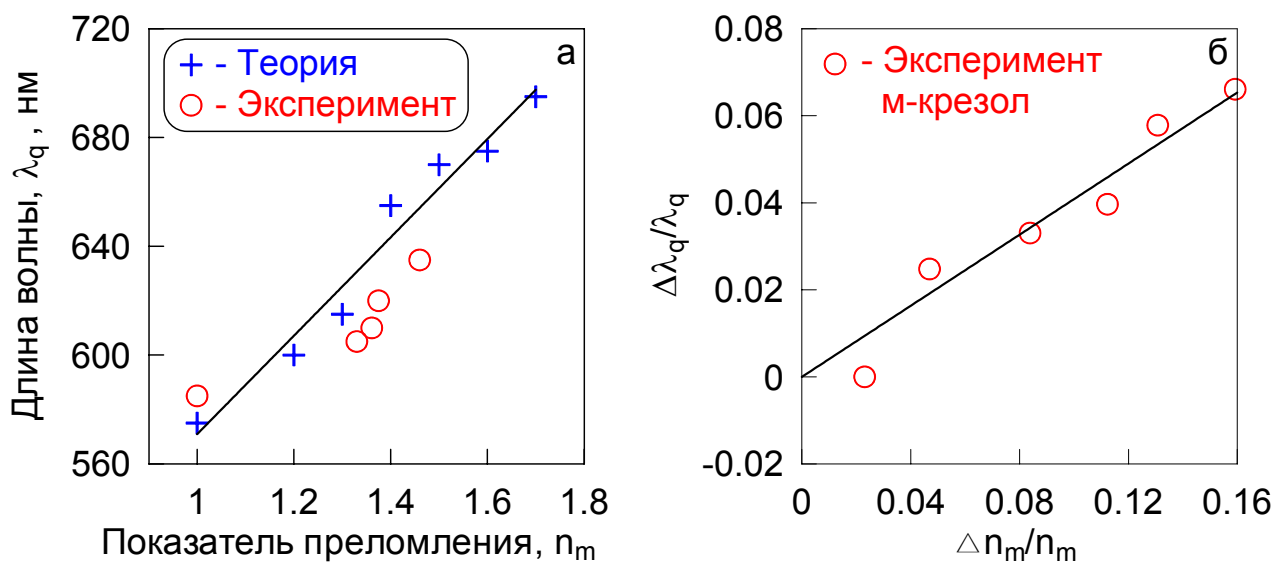


Рис. 12. (а) Экспериментальная (кружки) и теоретическая (крестики) зависимости длины волны квадрупольного резонанса λ_q от показателя преломления внешней среды n_m . Вычисления и измерения для монослоя из наноболочек SiO_2/Au (190/25 нм) в воздухе, воде, этаноле, гексане, четырёххлористом углероде. (б) Экспериментальная зависимость $\Delta\lambda_q/\lambda_q$ от $\Delta n_m/n_m$ для этого же монослоя в воде и растворах м-крезола (0, 20, 40, 60, и 80%). Прямыми линиями показаны линейные аппроксимации теоретических (а) и экспериментальных (б) данных.

Глава 4 посвящена разработке и экспериментальной апробации метода обработки темнопольных светомикроскопических изображений клеток, меченных резонансно рассеивающими конъюгатами наноболочек.

В качестве экспериментальной модели использовали не прямое мечение клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) с помощью фаговых миниантител (PhAb), специфичных к молекулярным рецепторам на поверхности клеток, и конъюгаты золотых наноболочек с кроличьими антифаговыми антителами (anti-PhAb). Наноболочки были получены как описано выше. Для тиолирования кроличьих антифаговых антител (anti-PhAb) использовали OPSS-PEG-NHS ($M_w=2000$ Да, Creative PEGWorks, США). Для дот-анализа использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, США), и овечьи антитела к иммуноглобулинам IgG кролика (ICN/CARPEL, США).

Клеточная линия СПЭВ была получена из лаборатории вирусологии Саратовской научно-исследовательской ветеринарной станции Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ НИВС РАСХН). Клетки культивировались на RPMI-1640 среде, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% антибиотиков (гентамицин и амфотерицин) в CO_2 инкубаторе при 37°C и 5% CO_2 в течение семи дней до концентрации $5-8 \times 10^8$ клеток/мл. PhAb на клетки СПЭВ были получены из овечьей комбинаторной фаговой библиотеки антител, любезно предоставленной профессором У. Харрисом (университет г. Абердина, Великобритания). Для получения PhAb было проведено 3 раунда селекции, полученные специфичные фаги были проверены методом дот-анализа.

Выращенные клетки дважды отмывали в 0.2 М фосфатном буфере и смешивали с фагами из расчета 500 фагов на клетку и оставляли реагировать на ночь при 4°C . В результате происходила адсорбция PhAb на клеточной мембране. Для блокирования сайтов неспецифического связывания покрытые PhAb клетки суспендировали в растворе бычьего сывороточного альбумина (БСА) с концентрацией 2 мг/мл в 0.2 М PBS буфере и оставляли при 4°C на 30 минут. Схема протокола мечения показана на рис. 13.

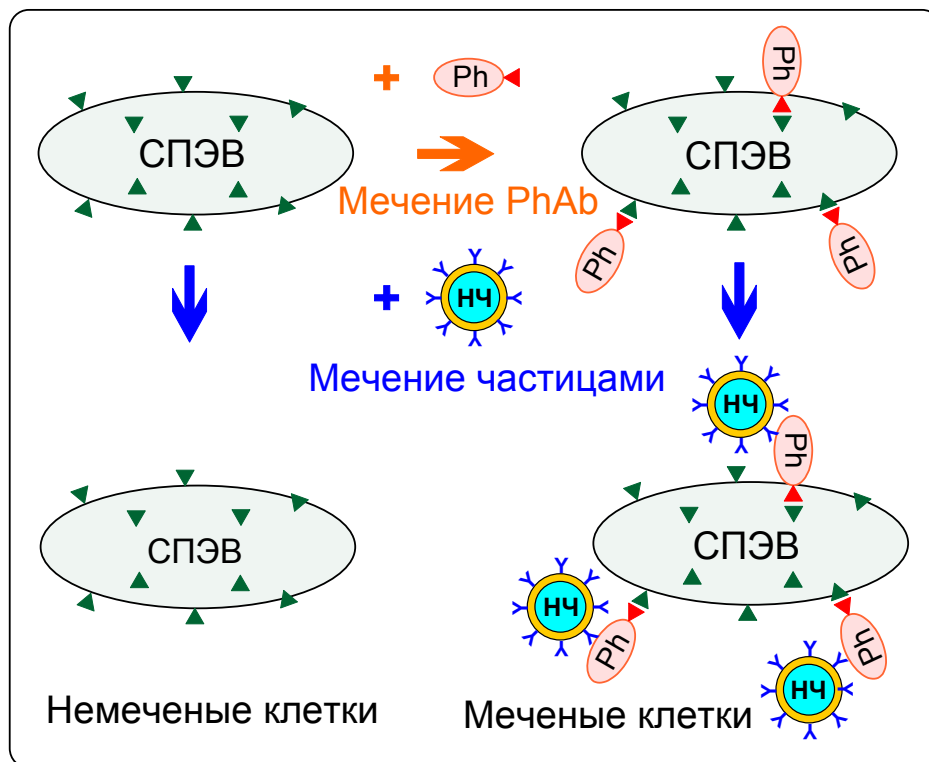


Рис. 13. Схема непрямого мечения клеток СПЭВ. На первом шаге клетки СПЭВ инкубировались с PhAb (Ph). На втором шаге клетки, покрытые PhAb, инкубировались с конъюгатами золотых наноболочек (НЧ) с кроличьими антителами (anti-PhAb). В случае негативного контроля биоспецифического мечения не происходило.

Далее по 100 мкл конъюгатов наноболочек добавляли к 1 мл меченых PhAb и немеченых (контрольных) клеток СПЭВ, инкубировали в течение 1 часа и отмывали центрифугированием при 180 g 10 минут. Клетки "контроля" не изменили цвета после инкубации с конъюгатами, а в пробирке с мечеными PhAb клетками наблюдался осадок зелёного цвета, что свидетельствовало об успешном присоединении конъюгатов золотых наноболочек (рис. 14). Для фиксации сформировавшихся комплексов использовали 3.7% раствор формалина в воде.

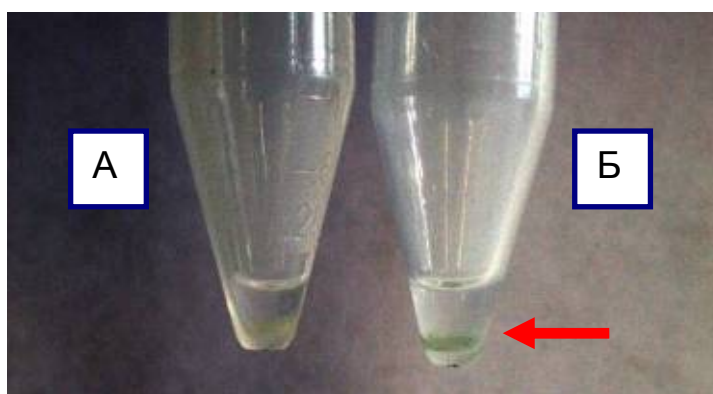


Рис. 14. Контрольные (А) и покрытые PhAb (Б) клетки СПЭВ после инкубации с конъюгатами наноболочек и центрифугирования. Красная стрелка указывает на зелёный осадок, который свидетельствует об успешном связывании клеток, покрытых PhAb, с конъюгатами золотых наноболочек.

Методом дот-анализа проверяли взаимодействие клеток СПЭВ с фаговыми миниантителами PhAb, которое выявляли с помощью конъюгата наноболочек (рис. 15). В первую клетку верхнего ряда мембраны наносили 1 мкл суспензии клеток СПЭВ (с концентрацией примерно 10^7 клеток/мл). В следующие клетки ряда наносили двукратные разведения образца, нанесённого в первую клетку. В качестве негативного контроля в

клетки нижнего ряда слева направо наносили лимфоциты крысы с той же концентрацией, как и СПЭВ. Для предотвращения неспецифического связывания блокировали мембрану в 2% растворе сухого молока 1 час. Для адсорбции фаговых миниантител на поверхности клеток инкубировали мембрану с PhAb 1 час. После этого помещали мембрану в раствор конъюгатов нанооболочек на 30 минут. Для клеток СПЭВ видны окрашенные пятна вплоть до концентрации клеток около 10^6 клеток/мл. Для негативного контроля окрашивания не происходило. Окрашивания так же не происходило и в случае клеток СПЭВ, немеченых PhAb (данные не представлены).

СПЭВ + PhAb + Конъюгаты нанооболочек с anti-PhAb

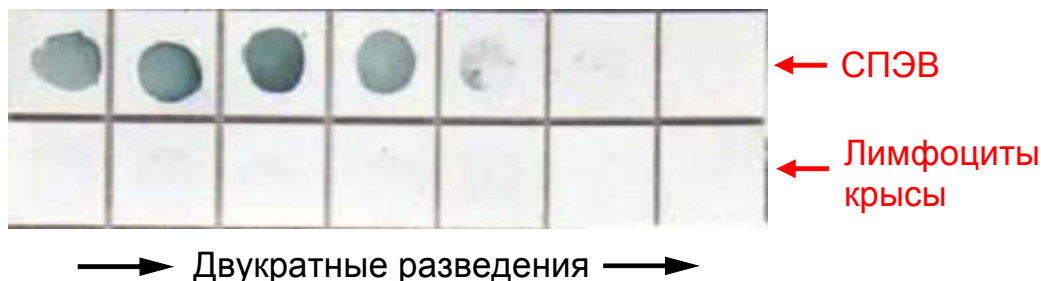


Рис. 15. Дот-анализ непрямого мечения клеток СПЭВ золотыми нанооболочками через фаговые миниантитела PhAb (верхний ряд клеток). В нижнем ряду в качестве негативного контроля нанесены лимфоциты крысы.

Фотографии клеток СПЭВ, меченых нанооболочками были получены методом темнопольной микроскопии с помощью микроскопа Leica 2500 DM, оборудованного цветной ПЗС-камерой. с использованием объектива с 40 кратных увеличением. Все изображения меченых и "контрольных" клеток получали при одинаковых условиях освещения. На темнопольных снимках нанооболочки выглядят как красные цветные пятна за счет интенсивного рассеяния света.

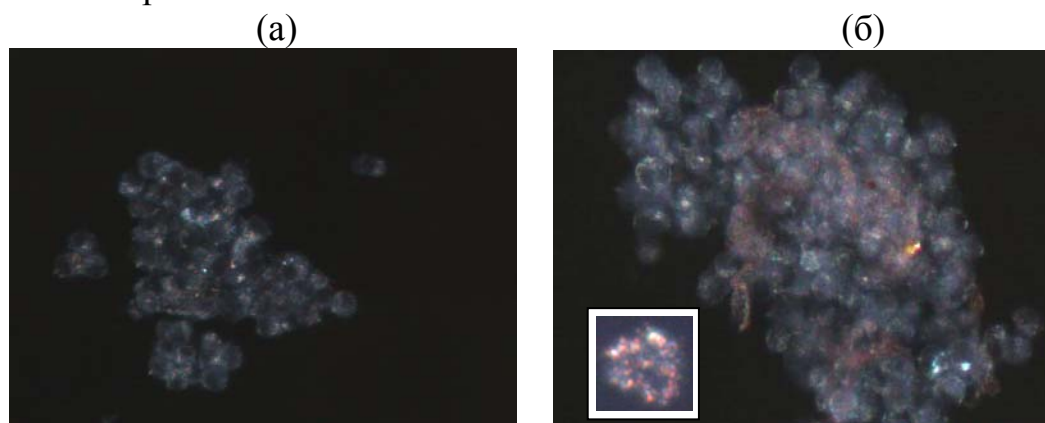
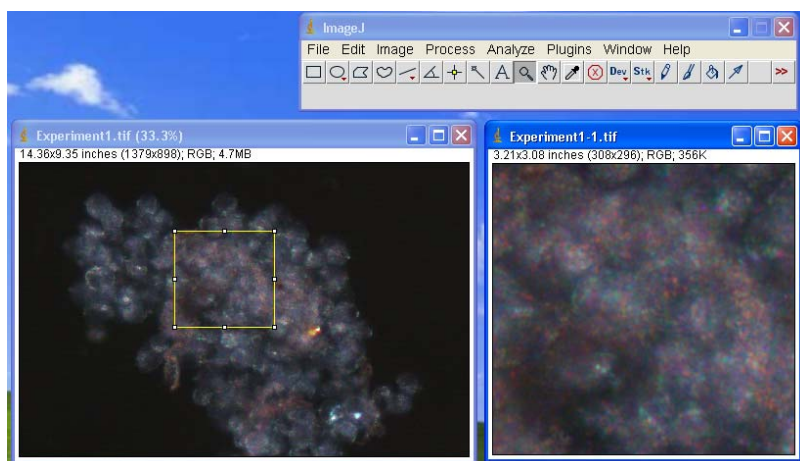


Рис. 16. Темнопольные изображения исходных клеток СПЭВ, инкубированных с конъюгатами золотых нанооболочек (негативный контроль, а), и клеток СПЭВ, которые инкубировались с PhAb и затем с конъюгатами золотых нанооболочек (б). На вставке показан увеличенный фрагмент, на котором отчетливо видно красное рассеяние от адсорбированных золотых нанооболочек.

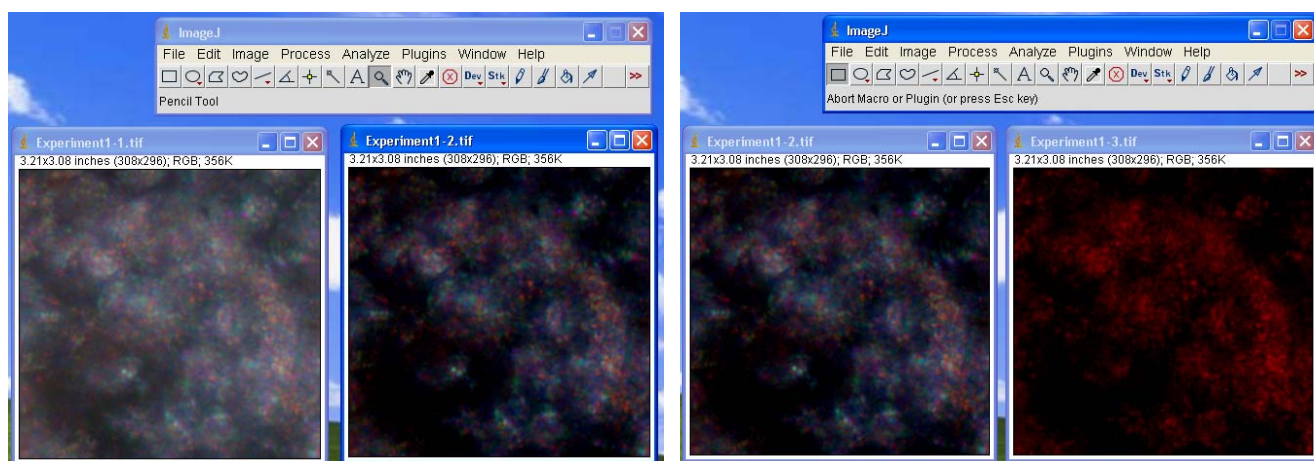
На рис. 16 приведены темнопольные фотографии клеток СПЭВ, которые инкубировались только с конъюгатами нанооболочек с anti-PhAb (а) а так же клеток СПЭВ, которые сначала инкубировались с PhAb и затем с конъюгатами нанооболочек (б). На темнопольных изображениях отчетливо была видна разница между биоспецифически (PhAb + конъюгат), неспецифически мечеными (только конъюгаты нанооболочек) и немечеными клетками. Однако визуально оценить эффективность мечения достаточно сложно. Для проведения количественного анализа и сравнения эффективностей

специфического и неспецифического мечения мы разработали и реализовали простой алгоритм анализа темнопольных фотографий на основе программы анализа изображений ImageJ. Обработка каждого изображения (и “контроля”, и “эксперимента”) включала несколько шагов.

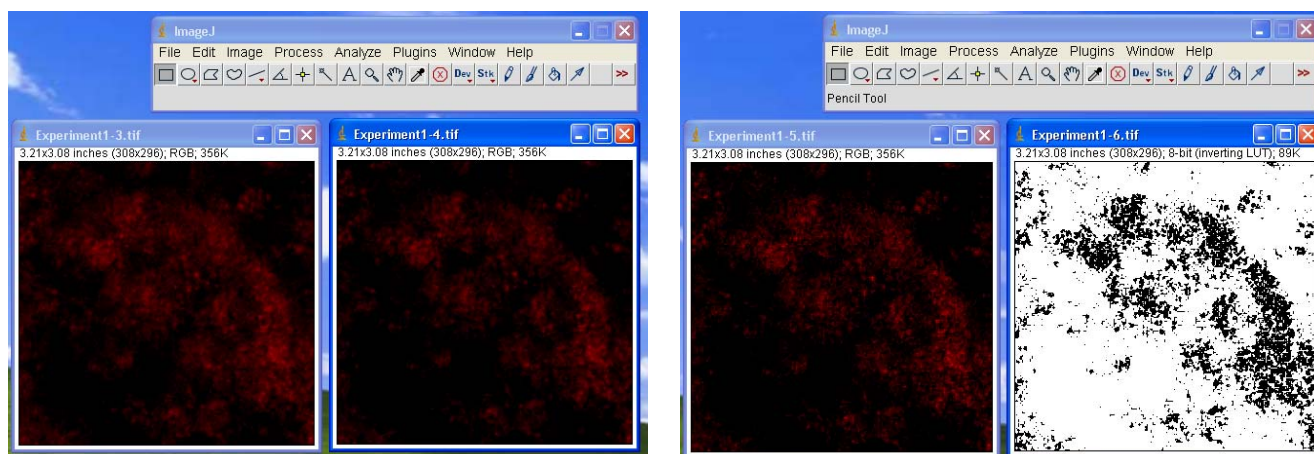
1) Выделение на изображении области, содержащей клетки.



2) Настройка контраста по пороговым значениям яркости 55-255. Такая настройка позволяет исключить из рассмотрения самые темные участки изображения. Затем проводили спектральную фильтрацию и через меню “Image – Adjust – Color balance”, проводили удаление синего и зелёного цветов.



3) Затем выбираем пороговые значения яркости в диапазоне 41-255. Для более точного подсчета пикселей мы использовали фильтр высоких частот, выбирая в меню “Process” пункт “Filters – Unsharp Mask” со значениями по умолчанию (Radius 1, Mask Weight 0.6). На финальном шаге проводили бинаризацию изображения используя пункт меню “Process – Binary – Make binary”.



С помощью инструмента “Analyze - Analyze Particles” подсчитывали количество пикселей, соответствующих частицам, и параметр эффективности мечения $LEF = S_{part} / S_{cell}$, где S_{part} - количество пикселей, соответствующих наноболочкам, а S_{cell} - полное число пикселей, которое занимают клетки. Для описанного примера LEF равен примерно 0.2. Стоит отметить, что это значение значительно выше среднего (см. таблицу 1). Операция была автоматизирована с помощью создания макроса. Макрос сохранялся в формате “txt” и содержал список выполняемых команд.

Из полученных результатов (таблица 1) следует, что хотя уровень неспецифического связывания оказывается заметным и превосходит значение для исходных немеченых клеток почти в 3 раза, значение LEF для случая специфического мечения оказывается в 17 раз выше, чем для неспецифического.

Таблица 1. Эффективность мечения для трёх образцов.

Номер образца	Тип мечения	LEF	LEF/LEF ₁ *
1	Исходные клетки СПЭВ	0.0006±0.0001	1
2	Клетки СПЭВ инкубировались только с конъюгатами** (неспецифическое мечение)	0.0017±0.0006	2.8
3	Клетки СПЭВ инкубировались с PhAb и затем с конъюгатами (специфическое мечение)	0.029±0.018	49

*LEF₁ обозначает LEF для образца 1. ** конъюгаты наноболочек с кроличьими антифаговыми антителами. #Стандартные отклонения рассчитывались для $n=5$ темнопольных фотографий каждого образца, взятых из разных уровней клеточной суспензии.

В **заключении** отмечается, что наночастицы с настраиваемым плазмонным резонансом имеют большие перспективы применения в современной нанобиотехнологии. В конце работы формулируются результаты и выводы.

Основные результаты и выводы:

1. На основе оригинального варианта иммерсионного метода показано, что средний эффективный показатель преломления наночастиц двуокиси кремния диаметром 50-250 нм, синтезированных по методу Стёбера, равен $n_{500} = 1.475 \pm 0.005$. Разработана оптическая методика определения среднего размера и концентрации золотых наноболочек на основе спектрального анализа суспензий наночастиц двуокиси кремния, используемых в качестве ядер.
2. Теоретически и экспериментально показано, что подавление дипольной полосы экстинкции является общим свойством плотноупакованных монослоев плазмонно-резонансных частиц и наблюдается при среднем межчастичном расстоянии около 0.1-0.2 диаметра в решеточных кластерах или при средней поверхностной плотности частиц около 0.25 в случайных кластерах с небольшим количеством частиц порядка 16-36. Изменение спектра экстинкции определяется коллективным рассеянием, а спектр поглощения изменяется мало. Спектральный сдвиг коллективного квадрупольного резонанса при изменении диэлектрического окружения подчиняется

линейному соотношению, установленному для дипольных и мультипольных резонансов отдельных частиц и пропорционален инкременту показателя преломления внешней среды.

3. Разработан новый метод оценки эффективности мечения клеток резонансно рассеивающими наночастицами, который позволяет достоверно отличить неспецифическое связывание от негативного контроля и в количественной форме оценить эффективность биоспецифического связывания конъюгатов с клетками. Метод экспериментально проверен на модели непрямого биоспецифического мечения клеток почек эмбриона свиньи с использованием фаговых миниантител и конъюгатов золотых наноболочек с антифаговыми антителами.

Список цитированных работ:

- Л1. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: Синтез, свойства, биомедицинское применение. М: Наука, 2008;
- Л2. Lal S., Clare S.E., Halas N. // Acc. Chem. Res. 2008. V. 41. P. 1842.
- Л3. Хлебцов Н.Г. и др. Российские нанотехнологии // 2007. Т. 2. С. 69; Khlebtsov N.G., Dykman L.A. // JQSRT. 2010. V. 111. P. 1-35.
- Л4. Pelton M., Aizpurua J., Bryant G. // Laser Photon Rev. 2008. V. 2, P. 136.
- Л5. Zagaynova E. V. et al. // Phys Med Biol. 2008. V. 53, P. 4995.
- Л6. Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. // Nanotechnology. 2008. V.19. P. 435703.
- Л7. Pham T., Jackson J.B., Halas N.J., Lee T.R. // Langmuir. 2002. V. 18. P. 4915.
- Л8. Malynych S., Chumanov G. // J. Am. Chem. Soc. 2003. V. 125. P. 2896.
- Л9. K. Fu et al. // Nanotechnology. 2008. V. 19. P. 045103.
- Л10. Heller W. // J. Chem. Phys. 1964. V. 40. P. 2700.
- Л11. Mackowski D. W. // JQSRT 2007. V. 109. P. 788.
- Л12. Wang H., Kundu J., Halas N.J. // Angew. Chem., Int. Ed. 2007. V. 46, P. 9040.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Статьи в изданиях из Перечня ВАК РФ:

1. Khlebtsov B.N., **Khanadeev V.A.**, Khlebtsov N.G. Determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra // Langmuir. - 2008. - V. 24, No. 16. - P. 8964-8970.
2. Khlebtsov B.N., **Khanadeyev V.A.**, Jian Ye, Mackowski D.W., Borghs G., Khlebtsov N.G. Coupled plasmon resonances in monolayers of metal nanoparticles and nanoshells // Phys. Rev. B. - 2008. - V. 77, No. 3. - P. 035440 (14 pages).
3. Хлебцов Б.Н., **Ханадеев В.А.**, Хлебцов Н.Г. Коллективные плазмонные резонансы в монослое металлических наночастиц и наноболочек // Оптика и спектроскопия . - 2008. - Т. 104, №2. - С. 324-337.
4. Хлебцов Б.Н., **Ханадеев В.А.**, Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. Использование золотых наноболочек в твердофазном иммуноанализе // Российские нанотехнологии. - 2008. - Т. 3, № 7-8. - С. 50-63.
5. Хлебцов Б. Н., **Ханадеев В.А.**, Хлебцов Н.Г. Определение размера, концентрации и показателя преломления наночастиц оксида кремния методом спектротурбидиметрии // Оптика и спектроскопия. - 2008. - Т. 105, № 5. - С. 801-808.
6. **Khanadeev V.A.**, Khlebtsov B.N., Staroverov S.A., Vidyasheva I.V., Skaptsov A.A., Ileneva E.S., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Quantitative cell bioimaging using gold-nanoshell conjugates and phage antibodies // J. Biophotonics. - 2010. DOI 10.1002/jbio.200900093.

7. Khlebtsov B. N., **Khanadeyev V.A.**, Verin D.A., Khlebtsov N. G. Optical properties of gold nanoshells planar arrays // Proc. SPIE. - 2007. - V. 6536. - P. 653602 (8 pages).
8. Boris Khlebtsov, **Vitaly Khanadeev**, Vladimir Bogatyrev, Lev Dykman, and Nikolai Khlebtsov. Engineering of plasmon-resonant nanostructures for biomedical applications // Tenth Conference on Electromagnetic and Light Scattering, Ed. by G. Videen, M. Mishchenko, P. Mengüç, Zakharova N. - 2007, pp. 77-81.
9. Khlebtsov B.N., **Khanadeyev V.A.**, Khlebtsov N.G. Amplification of the solid-phase dot assay sensitivity by using silica/gold nanoshells // Proc. of 10th Analytical Russian-German-Ukrainian Symposium ARGUS'2007-Nano-analytics, August 26-30, 2007, P. 64-67.
10. Хлебцов Б. Н., **Ханадеев В. А.**, Хлебцов Н.Г. Коллективные плазмонные резонансы в монослое металлических наночастиц и нанооболочек: Моделирование и эксперимент // В сб. материалов научной школы-конференции «Нелинейные дни в Саратове для молодых - 2007», Саратов: ООО ИЦ Наука, 2008, с. 211-214.
11. **Khanadeyev V.A.**, Khlebtsov B.N., Khlebtsov N.G. Coupled plasmon resonance in self-assembled monolayers of silica/gold nanoshells: computer simulations and experiment // Saratov Fall Meeting 2007, Int. School for Young Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics. URL: <http://optics.sgu.ru/SFM/2007/report/433>
12. Boris Khlebtsov, **Vitaly Khanadeev**, Nikolai Khlebtsov. Determination of the size, concentration, and refractive index of silica nanoparticles from turbidity spectra // ibid. URL: <http://optics.sgu.ru/SFM/2008/report/693>.
13. Хлебцов Б.Н., **Ханадеев В.А.**, Хлебцов Н.Г. Золотые нанооболочки: синтез, оптические свойства и применения в биологии и медицине // Сборник тезисов докладов участников Международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий, Москва, 2008, с. 610-611.
14. **Ханадеев В.А.**, Староверов С.А., Хлебцов Б.Н., Видяшева И.В., Скапцов А.А., Иленева Е.С., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. Количественный биоимиджинг раковых клеток с использованием плазмонно-резонансного светорассеяния и непрямого мечения золотыми нанооболочками через фаговые миниантитела // Матер. конференции с межд. участием «Нанотехнологии в онкологии», Москва, 9-10 октября 2009.
15. **Vitaly A. Khanadeev**, S.A. Staroverov, B.N. Khlebtsov, I.V. Vidyasheva, A.A. Skaptsov, E.S. Ileneva, V.A. Bogatyrev, L.A. Dykman, N.G Khlebtsov. Cancer cell imaging with gold nanoshells conjugated to phage miniantibodies // Saratov Fall Meeting 2009, International School for Young Scientists and Students on Optics, Laser Physics & Biophotonics. URL: <http://optics.sgu.ru/SFM/2009/report/795>

Формат 60×84 1/16. Гарнитура Times New Roman 10,
Объем 1 п. л. Тираж 100. Заказ 57.

Отпечатано в ИБФРМ РАН
Саратов, пр. Энтузиастов 13.

