

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

Кафедра общей и неорганической химии
наименование кафедры

**Влияние доксорубина на фотолюминесцентные свойства
квантовых точек $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$, покрытых тиогликолевой кислотой
в присутствии бычьего сывороточного альбумина**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 411 группы

направления 04.03.01 «Химия»

код и наименование направления

Института химии

наименование факультета

Корнышевой Юлии Андреевны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

Проф.кафедры, д.х.н., проф.

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

С.П. Курчаткин

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:

д.х.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

И.Ю. Горячева

инициалы, фамилия

Саратов 2024

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. На сегодняшний день рак стал одним из самых распространенных и опасных заболеваний в мире. Разработка новых, более совершенных методов лечения онкологических заболеваний является актуальной задачей для современной науки.

Одним из основных лекарственных препаратов применяемых в химиотерапии является доксорубин. Он относится к группе антрациклиновых антибиотиков, которые могут взаимодействовать с ДНК раковых клеток, приводя к их разрушению и гибели. Однако, несмотря на свою эффективность в лечении онкозаболеваний, доксорубин довольно токсичен, и, в зависимости от дозы и частоты применения, он может вызывать ряд побочных эффектов.

Поэтому возникает необходимость отслеживать его точное содержание в организме человека.

Бычий сывороточный альбумин (БСА) – основной транспортный белок сыворотки крови крупного рогатого скота, является удобной моделью для биомедицинских исследований связывания с молекулами в связи с его хорошей изученностью. Его часто используют для более точного моделирования и анализа сложных взаимодействий между молекулами и компонентами внутри живого организма.

В методах определения лекарственных препаратов, основанных на флуоресценции, широкое применение нашли полупроводниковые люминесцентные нанокристаллы-квантовые точки с уникальными оптоэлектронными свойствами, размер которых варьируется в диапазоне от 1 до 10 нм.

Тройные квантовые точки $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ имеют высокий квантовый выход, отличаются высокой фотостабильностью, а также являются малотоксичными, что делает их потенциально привлекательными кандидатами для использования во многих биомедицинских исследованиях.

Мониторинг концентраций химиотерапевтических препаратов с помощью

тушения флуоресценции квантовых точек (КТ) — это актуальное направление, которое и определило выбор темы дипломной работы.

Цель исследования заключается в проведении анализа фотолюминесцентных свойств квантовых точек в тройной системе — квантовые точки (КТ)/доксорубицин(Докс)/бычий сывороточный альбумин (БСА).

Объектом исследования выбраны КТ состава $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$, покрытые тиогликолевой кислотой.

Задачи, поставленные при написании работы – получить и охарактеризовать фракции КТ состава $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$, стабилизированные тиогликолевой кислотой, выбрать оптимальные образцы для проведения дальнейших исследований, провести количественную оценку эффективности тушения ФЛ КТ в присутствии Докс, провести количественную оценку эффективности тушения ФЛ КТ в присутствии Докс и БСА.

Структура и объем работы. Выпускная квалификационная работа (ВКР) состоит из раздела обозначений и сокращений, введения, трех глав («Литературный обзор», «Экспериментальная часть», «Результаты и обсуждения»), выводов и списка использованных источников. В тексте работы содержатся таблицы, уравнения и графические иллюстрации. Общий объем ВКР составляет 45 страниц, включая 17 рисунков и 2 таблицы.

Основное содержание работы.

В главе 1 представлен обзор литературы, в котором обсуждается противоопухолевый препарат доксорубицин - его оптические и фармакологические свойства, аналитические способы определения Докс, его взаимодействие с альбуминами, в частности с БСА, а также коллоидные квантовые точки (КТ) и методы их получения, взаимодействие доксорубицина с наночастицами. Особое внимание уделено тройным квантовым точкам, отличающимся низкой степенью токсичности.

В главе 2 описаны материалы и методы, используемые в работе.

В главе 3 обсуждаются экспериментальные и теоретические спектральные характеристики КТ и смеси КТ с Докс, а также тройной системы Докс + КТ + БСА, проведена оценка констант Штерна – Фольмера, констант связывания, количества сайтов связывания и расчет минимально определяемой концентрации Докс в используемых системах.

Доксорубицин. (Докс)

Докс является антибиотиком антрациклинового ряда и одним из наиболее широко применяемых химиотерапевтических препаратов для лечения различных злокачественных новообразований с конца 1960-х годов. Он представляет собой молекулу, состоящую из плоского антрахинонового ядра, которое присоединено к аминсахару посредством гликозидной связи. Аминогруппа сахара, которая способствует повышению растворимости в воде, протонируется, образуя гидрохлорид Докс. Плоская антрахиноновая часть молекулы является высоколипофильной, в то время как сахарная часть – гидрофильной [1].

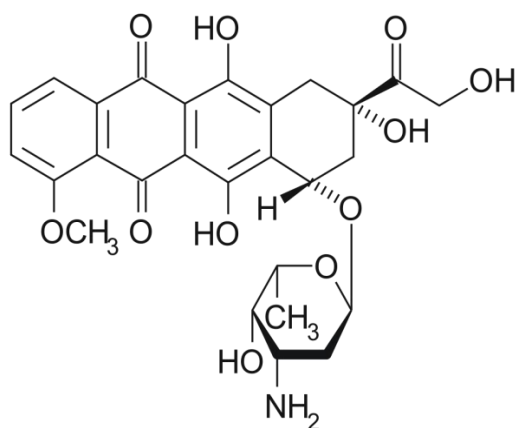


Рисунок 1 – Структурная формула Докс

Доксорубицин представляет собой красное кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде, с характерным поглощением в области видимого спектра. Его оптические свойства позволяют использовать его в спектроскопии, что находит применение в научных исследованиях.

Препарат широко применяется в онкологии для лечения различных видов рака, таких как рак молочной железы, рак яичников, лимфома и других злокачественных опухолей. Уникальные свойства доксорубицина позволяют ему эффективно бороться с раковыми клетками, что делает его ценным препаратом в борьбе с онкологическими заболеваниями

Бычий сывороточный альбумин (БСА).

БСА – белок плазмы крупного рогатого скота. Это основной транспортный белок сыворотки крови, является удобной моделью для биомедицинских исследований связывания с микромолекулами в связи с его хорошей изученностью.

Квантовые точки (КТ).

КТ представляют собой неорганические флуоресцирующие нанокристаллы размером от 1 до 20 нм. Благодаря своим очень маленьким размерам они обладают уникальными оптоэлектронными свойствами и ведут себя иначе, чем кристаллы в макромасштабе. Особенности КТ способствуют тому, что они стали широко использоваться в различных сферах человеческой деятельности. С помощью создания частиц, которые имеют очень маленькие размеры, стало возможным разработать и усовершенствовать способы доставки лекарств или их диагностики. Повышенное отношение поверхности к объему является наиболее важной характеристикой, способствующей использованию флуоресцентных нанокристаллов в медицинских и фармацевтических науках. Оно позволяет обеспечить соединение КТ с несколькими лигандами, а также способствует конъюгации КТ с различными лекарственными средствами. Основопологающими свойствами считаются диспергируемость и водопроницаемость, высокая интенсивность флуоресценции, биосовместимость и малые размеры.

КТ тройного состава I–III–VI₂ (I = Cu, Ag; III = In, Al, Ga; VI = S, Te, Se) имеют широкий спектр поглощения, высокую фотостабильность, но при этом не содержат в составе токсичных элементов и имеют характерную нестехиометрию, что позволяет использовать их в новых областях применения, таких как биомедицинские анализы.

Возросший интерес к использованию тройных коллоидных КТ в биомедицинских исследованиях (изучение физиологических процессов, диагностика различных заболеваний и др.) обусловлен не только их малыми размерами, настраиваемой эмиссией вплоть до ближней ИК-области и высокой стабильностью, но и отсутствием ионов тяжелых металлов (Cd, Pb, Hg) в их составе, что делает их малотоксичными для организма. Таким образом, сочетание уникальных оптических и электронных свойств, а также низкой степени токсичности, присущих полупроводниковым люминесцентным квантовым точкам (КТ) структуры I–III–VI₂, позволяет им быть новым классом люминесцирующих материалов, которые имеют преимущества перед традиционными КТ на основе кадмия.

Синтез. Квантовые точки AgInS₂/ZnS, были синтезированы методом нагрева водной смеси в течение часа при T 95-96 градусов. В качестве поверхностного лиганда и стабилизатора использовалась тиогликолевая кислота, выбор которой обусловлен малым размером молекулы и наличием функц. Карбоксильных групп, обеспечивающих гидрофильность наночастиц.

С целью дополнительной очистки и селективного разделения по размеру, проводилось фракционирование образцов с применением метода преципитации и последовательного центрифугирования. Результаты центрифугирования позволили получить 11 фракций КТ с максимальным КВ ФЛ 56 %.

С увеличением номера фракции размер КТ уменьшался, о чем свидетельствовал сдвиг края полосы поглощения в коротковолновую область и наблюдаемый в спектрах ФЛ сдвиг максимума полосы ФЛ от 611 нм для фракции №1 до 517 нм для фракции №11 (рисунок 2). В то же время интенсивность ФЛ была максимальной для промежуточных фракций.

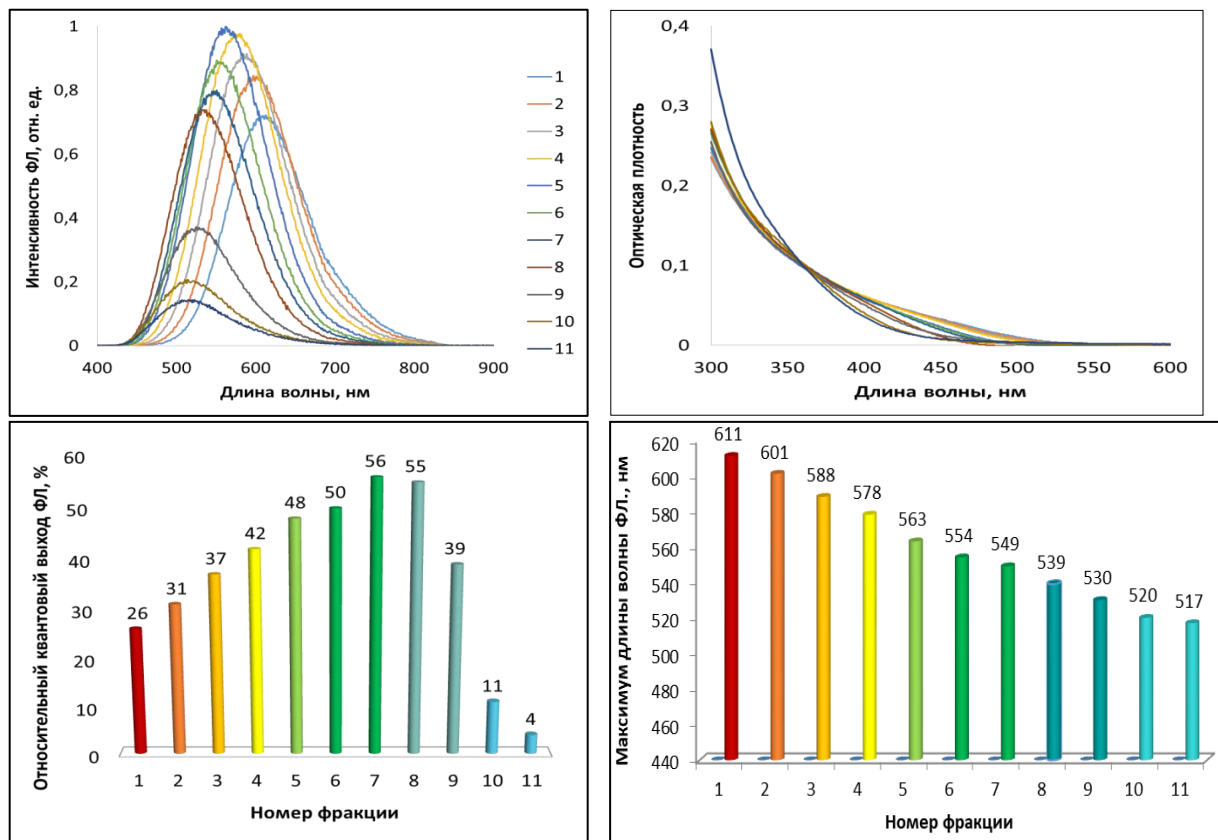


Рисунок 2 – а) Спектры ФЛ фракций №1-№11 КТ при $\lambda_{\text{возб.}} = 360 \text{ нм}$; б) Спектры поглощения фракций КТ; в) Значения относительного КВ ФЛ фракций КТ; г) Зависимость максимума длины волны ФЛ от номера фракций.

Для проведения дальнейших экспериментов были выбраны фракции КТ № 2 и №4, которые обладают цветовым контрастом, флуоресцируя в оранжевой и жёлтой областях спектра соответственно.

При оценке влияния Докс на фотолуминесцентные свойства фракций квантовых точек было установлено, что для обеих фракций наблюдалось тушение интенсивности ФЛ с увеличением его концентрации от 0,13 до 8,6 мкМ. (рис.3)

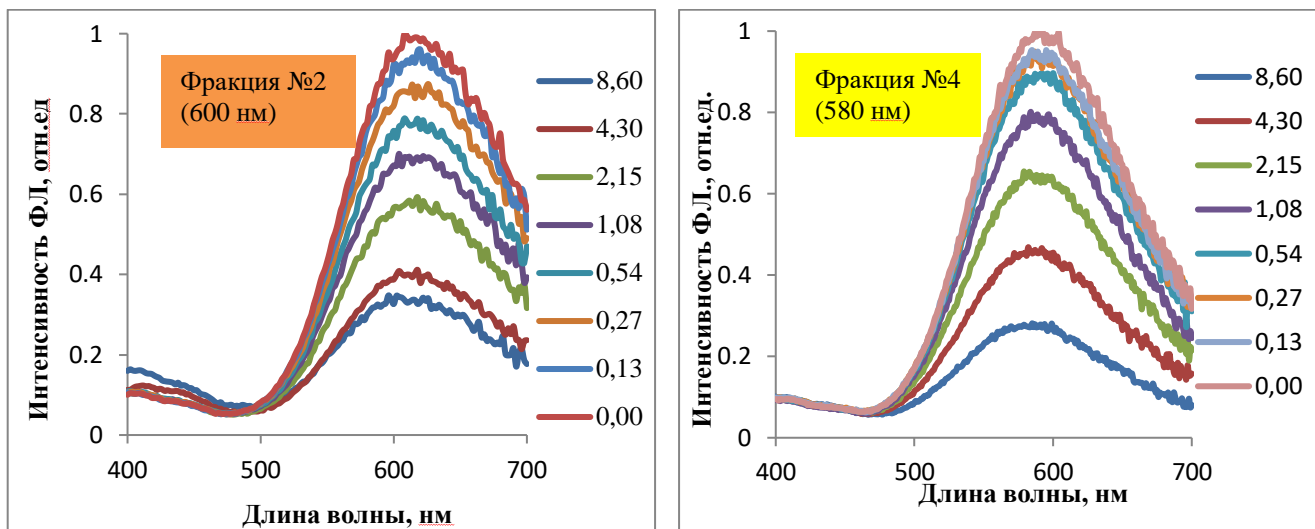


Рисунок 3 – Спектры ФЛ фракций КТ в присутствии концентраций Докс в диапазоне от 0,13 до 8,6 мкМ, $\lambda_{\text{возб.}} = 360 \text{ нм}$

На основании полученных данных, с целью более детального изучения процесса тушения, были построены профили тушения ФЛ (рисунок 7). Для этого интенсивность ФЛ фракций КТ в присутствии Докс нормировали на интенсивность ФЛ КТ в отсутствие Докс. Анализ профилей тушения в диапазоне концентраций Докс от 0,13 до 8,6 мкМ показал, что обе фракции обладают высокой чувствительностью к содержанию Докс в растворе. Тушение ФЛ было схожим для фракций №2 и №4 AgInS₂/ZnS КТ, что предположительно связано с незначительным изменением размера КТ и количеством лиганда ТГК на их поверхности.

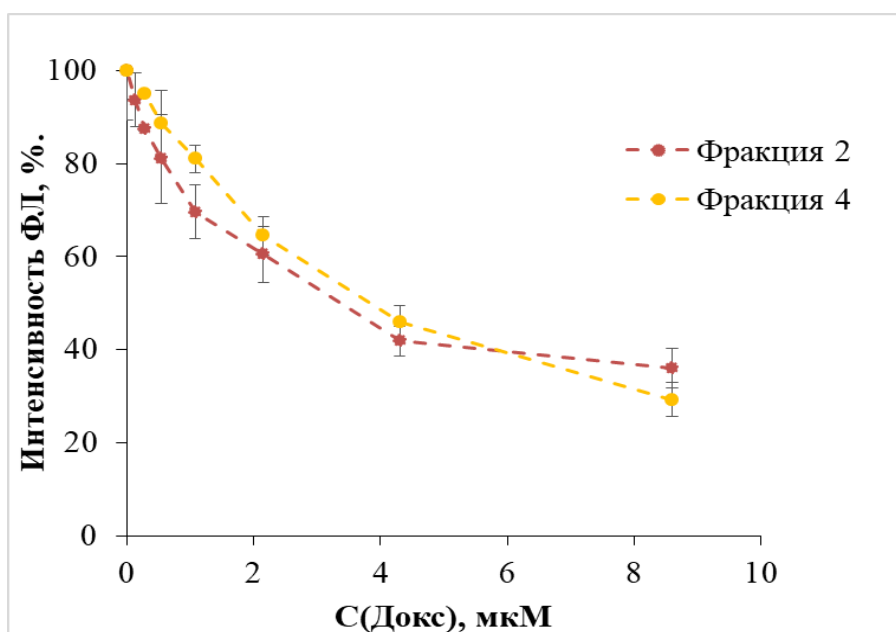


Рисунок 4 – Профили тушения ФЛ фракций КТ в присутствии Докс

Количественный анализ по изменению интенсивности ФЛ КТ в зависимости от концентрации Докс оценивали с помощью уравнения Штерна-Фольмера:

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q],$$

где I_F^0 и I_F - интенсивность ФЛ в отсутствие и в присутствии тушителя, $[Q]$ - концентрация тушителя (Докс) [моль л⁻¹], K_{SV} - постоянная Штерна-Фольмера [л моль⁻¹].

В исследованном диапазоне концентраций Докс (0-8,6 мкМ), графики Штерна-Фольмера не были линейными для всех фракций КТ. Отклонения в сторону уменьшения линейности графика Штерна-Фольмера показывают, что механизм тушения КТ под действием Докс сложен и может сочетать в себе динамическое и статическое тушение. Взаимодействие КТ в возбужденном состоянии и тушителя приводит к безызлучательной дезактивации КТ до основного состояния в случае динамического тушения, и к образованию нефлуоресцентного комплекса в основном состоянии в случае статического тушения.

Для определения констант Штерна-Фольмера были выбраны диапазоны концентраций Докс от 0 до 4,3 мкМ для фракций AgInS₂/ZnS КТ, поскольку при более высоких концентрациях Докс наблюдали отклонения от линейности в сторону уменьшения. Величина константы Штерна-Фольмера порядка 10⁶ свидетельствует о том, что Докс является эффективным тушителем ФЛ для КТ данного состава и структуры. При этом наиболее эффективное тушение ФЛ наблюдается для фракции №4 ($\lambda_{ФЛ}$ =580 нм), для которой константа Штерна-Фольмера была максимальной (4,1·10⁶ М⁻¹). Предел обнаружения для 4 фракции также показал высокую чувствительность и был определен как 0,25 мкМ.

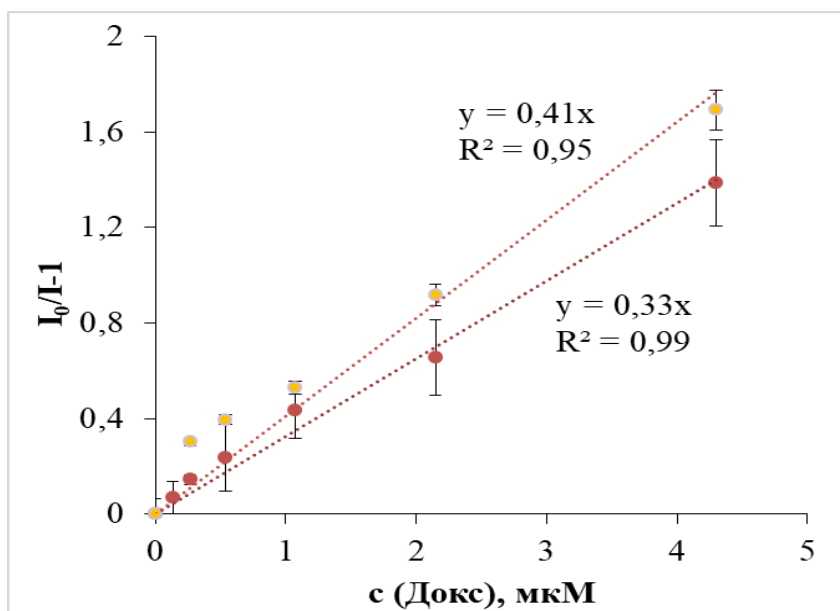


Рисунок 5 – Зависимость Штерна-Фольмера фракций КТ в присутствии Докс, диапазон концентраций 0-8,6 мкМ

С целью оценки связывания КТ с Докс были рассчитаны константы связывания, используя метод расчета для биомолекулярных систем. В настоящее время этот метод успешно используется для оценки связывания некоторых нанообъектов с различными молекулярными соединениями. Согласно этому методу, интенсивность ФЛ КТ зависит от концентрации Докс в соответствии со следующим уравнением.

$$\frac{I_0 - I}{I - I_s} = \left(\frac{[\text{Докс}]}{K_{\text{дисс}}} \right)^n$$

где I_0 , I_s и I - интенсивность ФЛ КТ в отсутствие Докс, в растворе Докс в насыщении и в присутствии тушителя, соответственно; $[\text{Докс}]$ - концентрация тушителя [моль л⁻¹]; $K_{\text{дисс}}$ - константа диссоциации, обратная константе связывания $K_{\text{связ}}$ [л моль⁻¹]; n - число эквивалентных сайтов связывания.

Двухлогарифмические графики тушения ФЛ КТ в зависимости от добавления Докс показаны на рисунке 13. Коэффициенты корреляции для КТ превышали 0,9 в выбранном диапазоне концентраций Докс, что подтверждает линейную зависимость. Рассчитанные значения констант связывания для фракций AgInS₂/ZnS КТ (таблица 1) для обеих фракций оказались похожи. Достаточно высокие значения констант связывания КТ с Докс подтверждают преобладание статического механизма процесса тушения. Количество эквивалентных сайтов связывания для всех КТ было близко к 1. Это дает представление о том, что один лиганд на поверхности КТ связывался с одной молекулой Докс, независимо от номера фракции и ее размера. Однако этот метод расчета был получен для молекулярных структур и не позволяет правильно оценить связывание Докс с нанокристаллом в целом, а учитывает только один лиганд на поверхности КТ.

	Фракция 2	Фракция 4
К связывания*10 ⁶ , М-1	1,00	1,01
КШтерна-Фольмера*10 ⁵ , М-1	3,3	4,1
n	1,26	0,85
ПрО*10 ⁻⁷ , М	2,6	2,5

Таблица 1. - Количественные характеристики фракций КТ №2, №4 с Докс (от 0,13 до 8,6 мкМ)

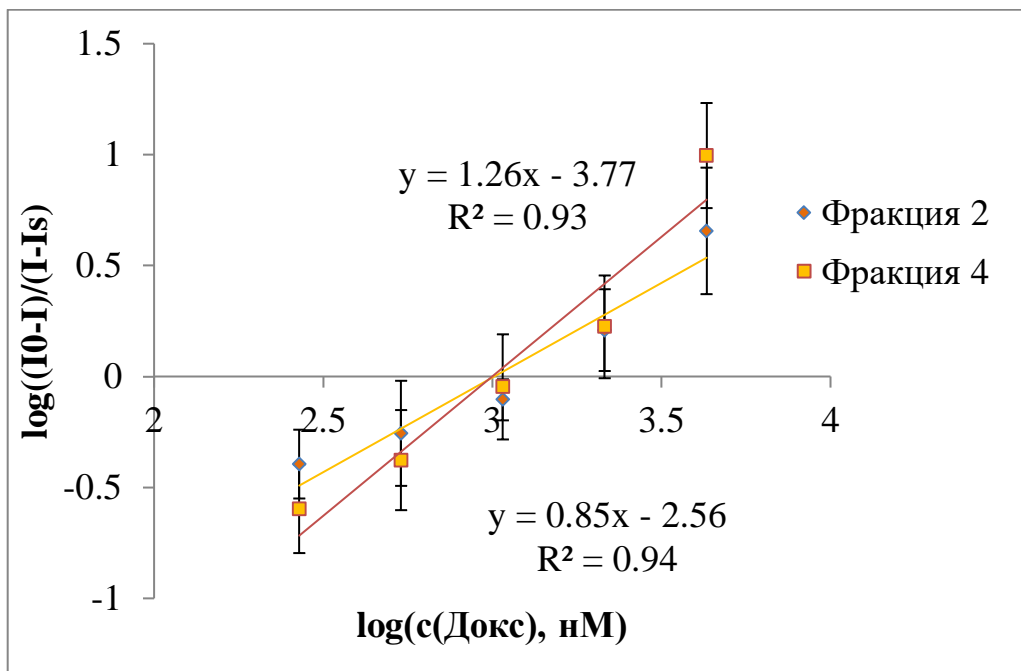


Рисунок 6 – Двухлогарифмический график тушения ФЛ фракций AgInS2/ZnS КТ в присутствии Докс(0-4,3мкМ)

Таким образом, полученные результаты по оценке влияния Докс на свойства фракций КТ AgInS2/ZnS, покрытых ТГК демонстрируют потенциал аналитического применения данной системы по определению концентрации Докс с высокой чувствительностью анализа.

Проанализировано влияние БСА на ФЛ КТ. При определённых концентрациях БСА в растворе интенсивность ФЛ КТ увеличивается. Вероятно, это связано с тем, что карбоксигруппы на поверхности квантовых точек электростатически взаимодействуют с аминокислотными остатками в составе БСА, что делает квантовые точки более стабильными в растворе.

Для изучения влияния Докс на ФЛ КТ в присутствии БСА, была взята концентрация БСА 15 мкМ, при которой увеличение ФЛ КТ максимальное. (рис. 7). При дальнейшем увеличении содержания БСА, ФЛ КТ уменьшается до изначального значения.

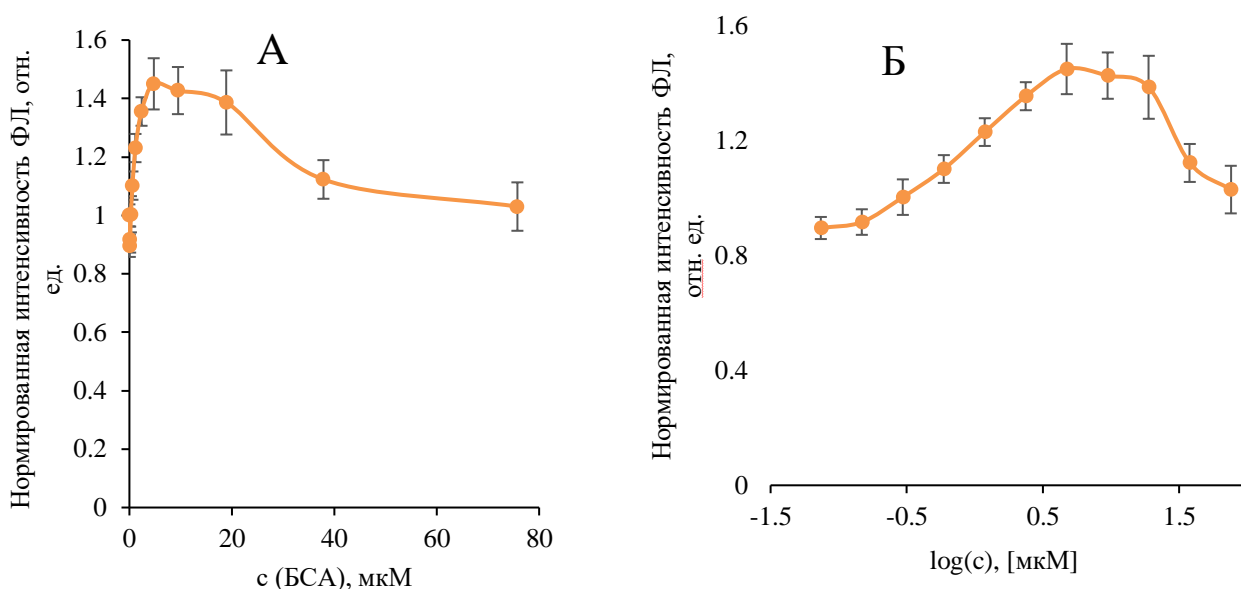


Рисунок 7 - Профиль изменения интенсивности ФЛ КТ ($2,5 \cdot 10^{-7}$ М) под влиянием БСА (0-75 мкМ) в линейных (А) и логарифмических (Б) координатах, λ возб. = 360 нм;

Стоит отметить, что наличие БСА не оказывало влияния на форму спектров ФЛ КТ, следовательно, структура квантовых точек сохранялась неизменной (Рис.8).

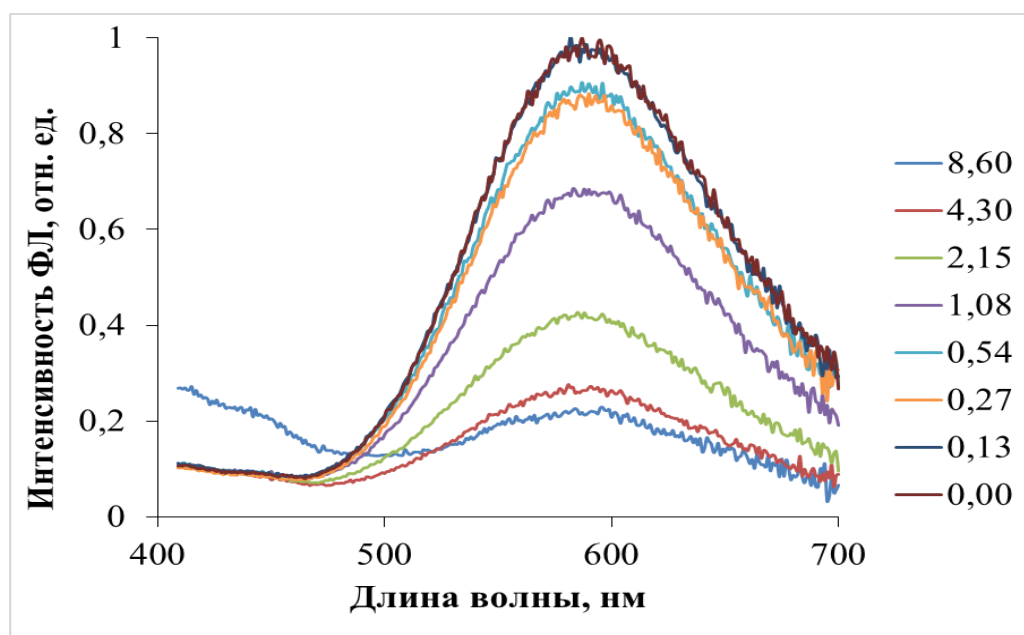


Рисунок 8 - Спектры ФЛ КТ AgInS₂/ZnS №4 (580 нм) в присутствии БСА (15 мкМ) и Докса (0,13-8,60 мкМ) при λ возб.=360 нм

Интенсивность ФЛ КТ в присутствии БСА также снижается при увеличении концентрации Докс. Предел обнаружения Докс квантовыми точками существенно увеличился с 0,25 мкМ до 1,9 мкМ. Причиной может быть связывание молекул

Докс с молекулами БСА, в связи с чем с КТ связывается меньшее количество молекул Докс. Количество сайтов связывания осталось равно двум, то есть на каждый лиганд на поверхности КТ приходится две молекулы Докс. (Рис. 16)

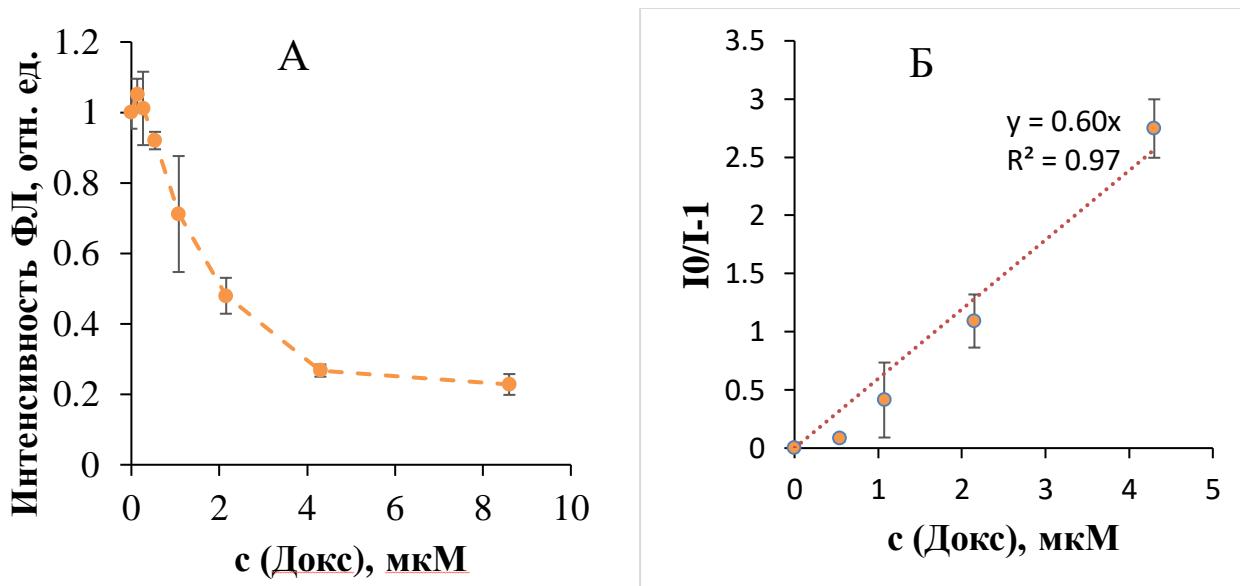


Рисунок 9 - Профиль тушения ФЛ КТ AgInS₂/ZnS (А); График Штерна-Фольмера КТ AgInS₂/ZnS (Б) в присутствии БСА (15 мкМ) и Докс (0,13-8,60 мкМ) в воде.

Также, как и без БСА в системе, ФЛ КТ снижается при увеличении концентрации Докс. Предел обнаружения Докс квантовыми точками значительно увеличился с 0,25 мкМ до 1,9 мкМ. Причиной может быть связывание молекул Докс с молекулами БСА, в связи с чем с лигандом на поверхности КТ связывается меньшее количество молекул Докс. Количество сайтов связывания также увеличилось с 1 до 2. (Рис.9)

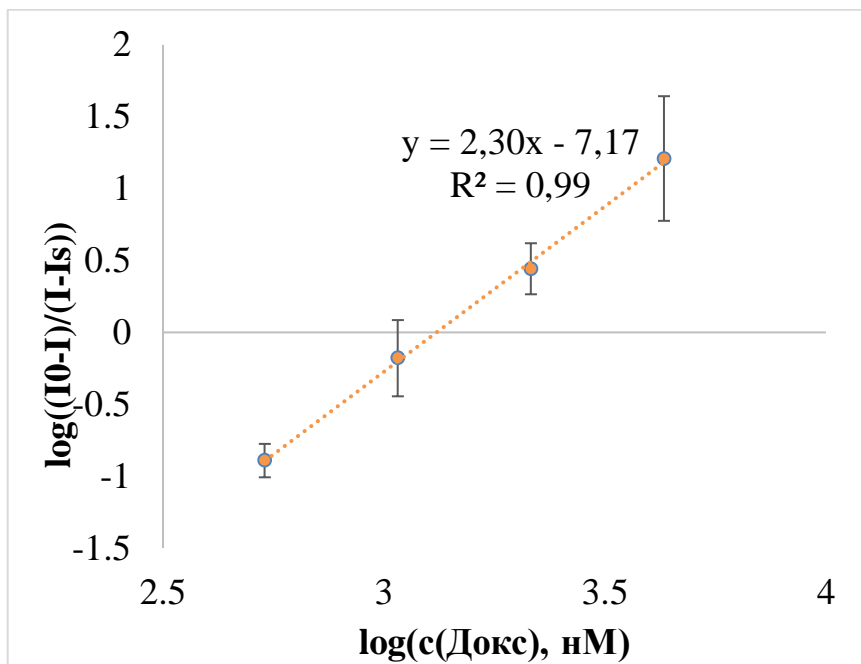


Рисунок 10 – Двухлогарифмический график тушения ФЛ фракций AgInS₂/ZnS КТ в присутствии Докс(0,1-4,3мкМ)

Рассчитанные количественные характеристики для фракции КТ №4 в присутствии Докс (0,1-4,3мкМ) и для этой же системы в присутствии БСА(15мкМ) приведены для сравнения в таблице 2.

	КТ+Докс	КТ+Докс+БСА
К связывания*10 ⁶ , М ⁻¹	1,01	1,31
КШтерна-Фольмера*10 ⁵ , М ⁻¹	4,1	6,0
n	0,85	2,30
ПрО*10 ⁻⁷ , М	0,25	1,9

Таблица 2 – характеристики для фракции КТ №4 в присутствии Докс (0,13-8,6мкМ) и для этой же системы в присутствии БСА(15мкМ)

В результате введения в систему белкового компонента, увеличился предел обнаружения препарата, потому что Докс в растворе связывался не только с КТ, но и с БСА.

Заключение

1. Получены фракции КТ состава $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$, покрытые ТГК в диапазоне излучения от 611-517 нм с максимальным КВ ФЛ 56 %.
2. Проведена оценка эффективности тушения фотолюминесценции фракций КТ №2, №4 в присутствии доксорубина.
3. Показано влияние Докс на интенсивность ФЛ фракций КТ в диапазоне концентраций от 0 до 8,6 мкМ. Установлено, что для исследуемых фракций происходит тушение интенсивности ФЛ фракций КТ в присутствии Докс с линейной зависимостью Штерна-Фольмера.
4. Выявлено, что наибольшая чувствительность к тушению наблюдается у фракции № 4. $K_{\text{Штерна-Фольмера}} = 4,1 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1}$, $K_{\text{св}} = 1,02 \cdot 10^{-6} \text{ М}$, с пределом обнаружения $0,25 \cdot 10^{-6} \text{ М}$.
5. Проанализировано влияние БСА на ФЛ КТ. В присутствии 15 мкМ БСА интенсивность ФЛ КТ увеличивается, при больших концентрациях БСА она возвращается к исходным значениям.
6. Проведена оценка эффективности тушения фотолюминесценции фракции №4 КТ в присутствии доксорубина и БСА. $K_{\text{св}} = 1,3 \cdot 10^{-6} \text{ М}$; $a_{\text{ПрО}} = 1,9 \cdot 10^{-6} \text{ М}$.