

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

**Определение доксорубина с использованием люминесцентных
наносенсоров на основе квантовых точек**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента (ки) 4 курса 411 группы

направления 04.03.01 «Химия»

код и наименование направления

Института химии

наименование факультета

Мещеряковой Светланы Андреевны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

к.х.н., старший преподаватель

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

Д.Д. Дрозд

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:

д.х.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание

дата, подпись

И.Ю. Горячева

инициалы, фамилия

Саратов 2024

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Доксорубин (Докс) – эффективный препарат из группы антрациклиновых антибиотиков, обладающий высокой активностью против многих видов раковых опухолей и широко использующийся в химиотерапии. Однако применение Докс вызывает разрушение как раковых, так и здоровых клеток. Он обладает высокой кардио-, цито- и нейротоксичностью. По этой причине необходимо постоянно отслеживать концентрацию Докс в организме [1].

Известны несколько способов мониторинга концентрации Докс в тканях и биожидкостях, однако они являются сложными и затратными. Кроме того, в химиотерапии применяют препараты, содержащие вспомогательные вещества, которые могут повлиять на правильность количественного определения Докс.

Докс обладает люминесценцией в диапазоне 540-660 нм, однако форма спектра сильно зависит от концентрации и ряда других факторов, что препятствует ее использованию в качестве метода определения концентрации. Спектр поглощения Докс находится в диапазоне 450-550 нм, что позволяет пользоваться методами флуоресцентного анализа с использованием наносенсоров на основе квантовых точек (КТ). Принцип аналитического тушения люминесценции КТ заключается в изменении интенсивности люминесценции в ходе взаимодействия поверхности наночастиц с молекулами тушителя [2].

Целью данной работы являлось разработать наносенсоры на основе полупроводниковых люминесцентных КТ для определения концентраций Докс.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи:**

- Модифицировать КТ составов CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS гидрофильными лигандами;

- Изучить влияние вспомогательных компонентов препарата синдроксоцина (лактозы) на люминесценцию КТ;
- Подобрать оптимальный диапазон концентраций водных растворов Докс и провели оценку чувствительности метода;
- Рассмотреть влияние плазмы крови на оптические свойства КТ;
- Исследовать чувствительность образцов КТ при тушении люминесценции Докс в плазме крови человека;

Краткая характеристика материалов исследования. Для решения поставленных в данной работе задач применяли физико-химические методы исследования, такие как флуориметрия и спектрофотометрия. Объектами исследования стали полупроводниковые люминесцентные КТ составов CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS, стабилизированные тиогликолевой (ТГК) и 3-меркаптопропионовой (МПК) кислотами, и противоопухолевый препарат синдроксоцин.

Описание структуры работы. Данная работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и обсуждения), заключения, инструктажа по технике безопасности и списка использованных источников. В тексте работы содержатся рисунки и таблицы. Общий объем работы составляет 49 страницы, включая 30 рисунков и 7 таблиц. Всего проанализировано 53 литературных источников.

Во **введении** сформулирована цель работы и обоснована актуальность темы.

В **первой главе** описаны свойства Докс, методы определения препарата, синтез, гидрофилизация и свойства полупроводниковых КТ.

Во **второй главе** приведена информация об используемых реактивах, приборах и оборудовании, методика синтеза и гидрофилизации КТ составов CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS, методики определения Докс с использованием КТ.

Третья глава посвящена описанию полученных результатов и их обсуждению.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Доксорубицин (Докс) – препарат из группы антрациклиновых антибиотиков, обладающий высокой активностью против многих видов раковых опухолей в химиотерапии. Применение Докс имеет существенные недостатки, заключающиеся в разрушении как раковых, так и здоровых клеток, так как Докс обладает высокой кардио-, цито- и нейротоксичностью. По этой причине необходимо постоянно отслеживать концентрацию Докс в организме пациентов [1]. Изучение поведения препарата показало, что Докс подвергается самоассоциации в водных растворах [3]. Выявлено, что изменение ионной силы, рН раствора [4], температуры [5] способствует самоассоциации Докс.

Известны несколько методов количественного определения Докс в жидкостях и тканях организма, например, спектрофотометрические методы [1] или высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентным спектрофотометрическим детектором [6]. Несмотря на широкое применение перечисленных методов, они имеют ряд недостатков, заключающихся в сложной и длительной пробоподготовке образцов биологических жидкостей или тканей, содержащих Докс, вследствие чего повышается стоимость и время анализа, а также снижается эффективность мониторинга и терапии. По этой причине необходима разработка альтернативного метода, повышающего эффективность определения, для последующей коррекции концентраций Докс во время курса химиотерапии.

Поскольку КТ на основе твердых растворов обладают чувствительностью к Докс, и аналитические методы, основанные на детекции сигнала люминесценции КТ, не ограничены матричным эффектом образца, было решено использовать их в дальнейшем как метку для определения Докс.

Полупроводниковые квантовые точки (КТ) – люминесцентные наночастицы, состоящие из полупроводниковых материалов, стабилизированных органическими молекулами в коллоидном растворе.

Оптические и физико-химические свойства КТ зависят от состава полупроводниковых материалов, входящих в состав наночастиц, а также от структуры наночастиц [7]. Для применения КТ в аналитических целях и реализации анализа биологических объектов наночастицам необходимо придать коллоидную стабильность в растворе.

Гидрофилизация – процесс замены лигандного слоя на поверхности наночастиц, синтезированных в органической фазе [8]. Для аналитического тушения люминесценции КТ оптимальными лигандами являются органические кислоты, содержащие тиоловые группы, такие как ТГК и МПК, так как в процессе гидрофилизации размер КТ сохраняется и остается достаточно маленьким (~5 нм). Кроме того, использование данных лигандов позволяет увеличить стабильность КТ за счет уменьшения количества дефектов на поверхности КТ, вследствие чего увеличивается интенсивность люминесценции наночастиц и их КВ [9].

В ходе исследования провели гидрофилизацию КТ состава CdZnSeS методом замены лигандов на ТГК и МПК. Использование наночастиц, стабилизированных разными лигандами, позволяет подобрать оптимальную аналитическую систему для дальнейшего применения в анализе. Квантовый выход (КВ) гидрофильных наночастиц значительно увеличивался, что связано со стабилизацией поверхности наночастиц в ходе присоединения лигандов (таблица 1).

Таблица 1 – КВ образцов КТ состава CdZnSeS до и после гидрофилизации

Образец КТ	КВ, %
КТ до гидрофилизации	32
КТ@МПК	71
КТ@ТГК	68

В работе использовали противоопухолевый фармацевтический препарат синдроксоцин, содержащий вспомогательные вещества, которые могут повлиять на люминесценцию КТ (таблица 2).

Таблица 2 – Состав синдроксоцина

Вещество	Содержание, мг
Доксорубин гидрохлорид	50
Метилпарагидроксибензоат	5
Лактоза безводная	250

В связи с этим проводили исследование влияние лактозы на люминесценцию КТ посредством добавления раствора лактозы (10 мг/мл) к коллоиду КТ (рисунок 1).

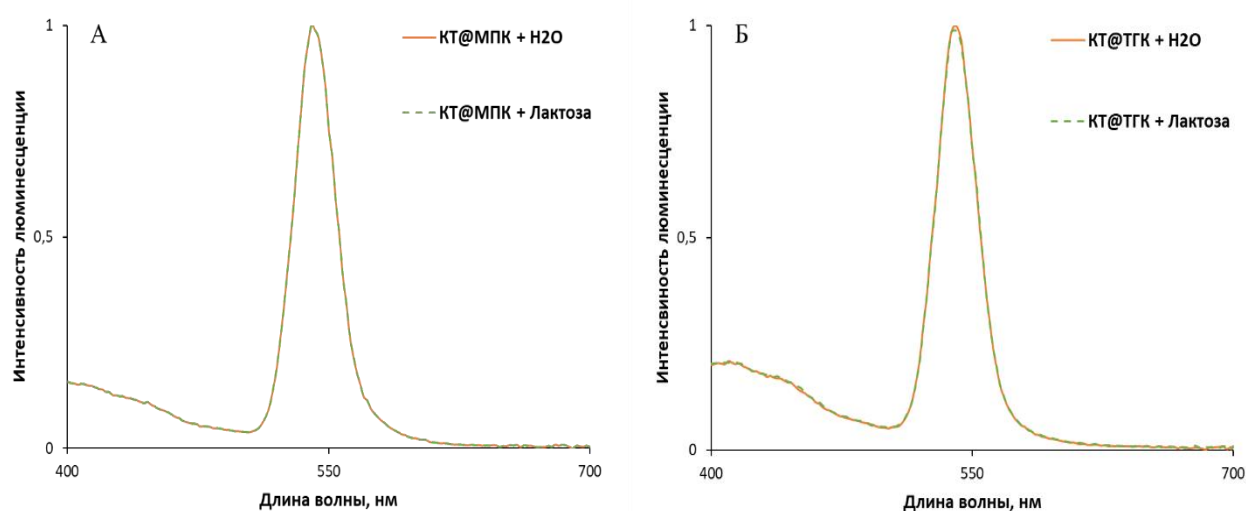


Рисунок 1– Влияние лактозы на люминесценцию КТ, стабилизированных МПК (А) и ТГК (Б)

Из полученных спектров люминесценции можно отметить, что раствор лактозы в концентрации, сопоставимой с содержанием лактозы в 6,1 мг препарата (5 мг) с учетом разбавления, не влияет на люминесценцию наночастиц, следовательно, вспомогательные вещества синдроксоцина не затрудняют определение Докс.

При определении влияния Докс на люминесценцию КТ сравнили спектры люминесценции КТ и водных растворов Докс в различных концентрациях (рисунок 2).

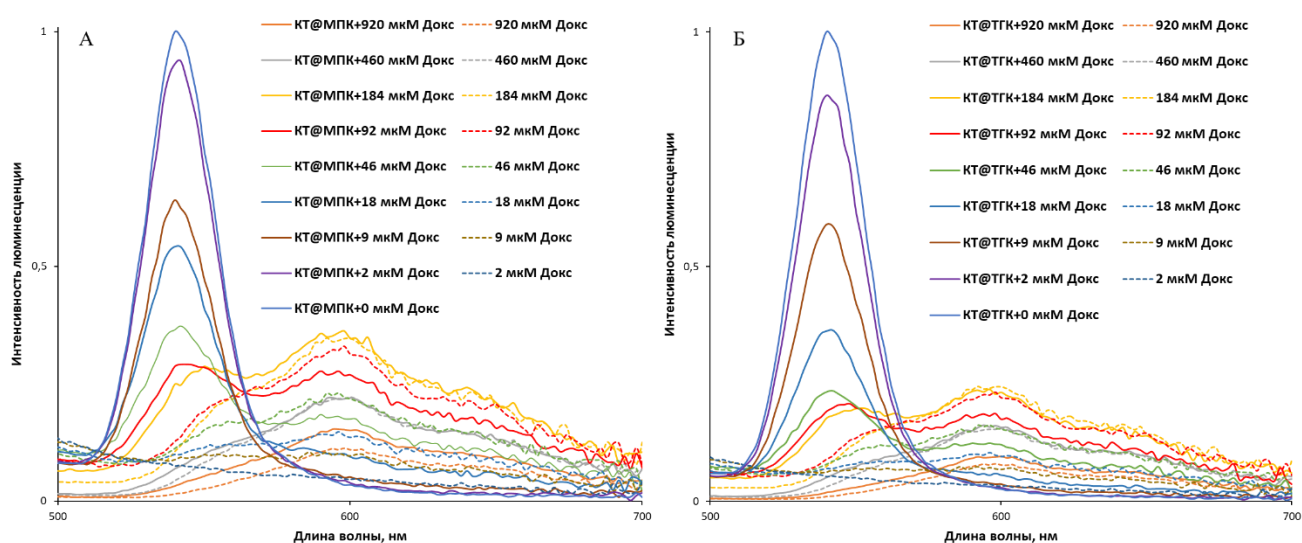


Рисунок 2 – Сравнение спектров люминесценции Докс и КТ, стабилизированных МПК (А) и ТКГ (Б), после добавления Докс

По спектрам люминесценции КТ видно, что под действием Докс интенсивность образцов КТ снижается в зависимости от добавляемого количества Докс. Спектры люминесценции Докс демонстрируют, что Докс обладает собственной люминесценцией, причем при добавлении КТ наблюдается возрастание интенсивности люминесценции вблизи длины волны люминесценции 550 нм и снижение интенсивности люминесценции вблизи длины волны люминесценции 600 нм, обусловленное эффектом внутреннего фильтра [10].

Поскольку между молекулами Докс и поверхностью КТ происходит электростатическое взаимодействие, а также наблюдается перекрывание спектров поглощения Докс и спектров люминесценции КТ, предполагается, что механизм тушения люминесценции наночастиц связан с фотоиндуцированным переносом электронов [11] или с флуоресцентной резонансной передачей энергии [12]. К тому же, рисунок 12 демонстрирует, что Докс обладает собственной люминесценцией. Чтобы провести оценку вклада люминесценции

Докс в общую интенсивность люминесценции и определить предельную концентрацию Докс для количественного определения, построили зависимость интенсивности люминесценции КТ в присутствии Докс и водных растворов Докс при $\lambda_{\text{макс.}} = 540$ нм от концентрации Докс (рисунок 3).

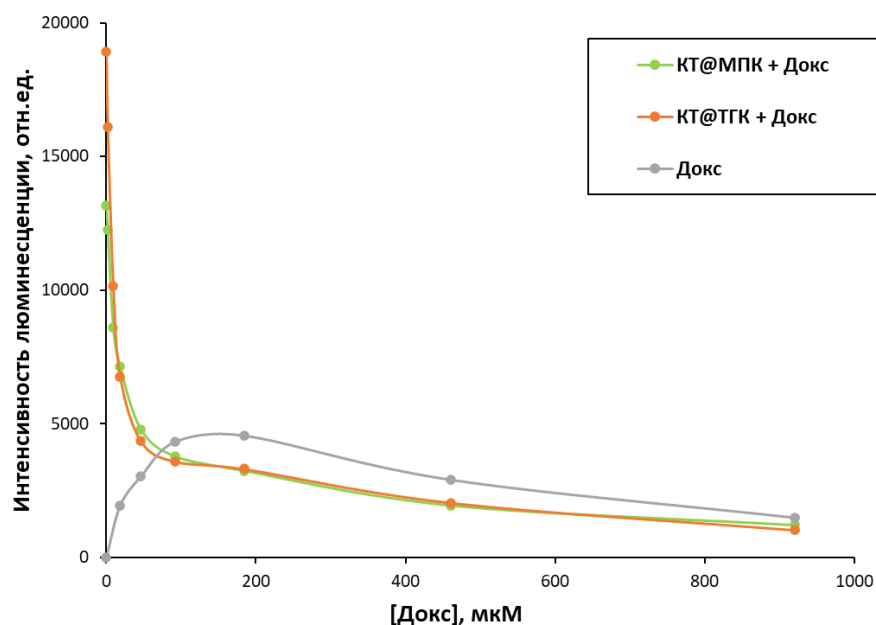


Рисунок 3 – Зависимость интенсивности люминесценции КТ в присутствии препарата от концентрации Докс

Полученная концентрационная зависимость демонстрирует, что при концентрациях Докс выше 92 мкМ наблюдается значительный вклад Докс в общую интенсивность люминесценции. Следовательно, предельная концентрация для количественного определения Докс с использованием люминесцентных наносенсоров на основе КТ составляет 92 мкМ.

Для выявления зависимости снижения интенсивности люминесценции КТ от концентрации Докс, построили графики Штерна-Фольмера и профиль тушения люминесценции (рисунок 4).

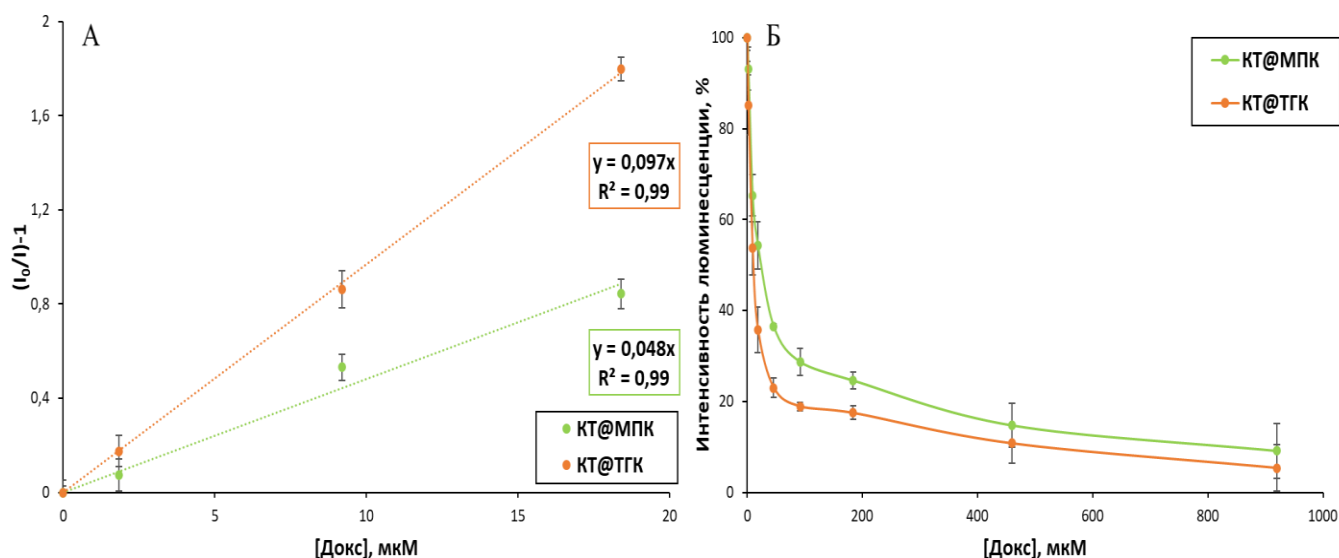


Рисунок 4 – Графики Штерна-Фольмера (А) и профиль тушения люминесценции КТ в присутствии Докс (Б)

Рисунок 14 (А) демонстрирует, что константа тушения для КТ, стабилизированных ТГК, составила $9,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, для КТ, стабилизированных МПК, – $4,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Следовательно, КТ, стабилизированные ТГК, имеют большую чувствительность к тушению под действием водных растворов Докс.

Из профиля тушения люминесценции выявлено, что интенсивность люминесценции КТ, стабилизированных ТГК, под действием Докс снижается сильнее, чем в случае КТ, стабилизированных МПК. Следовательно, КТ, стабилизированные ТГК, имеют большую чувствительность к тушению люминесценции под действием Докс. Вероятно, это связано с меньшим размером лигандного слоя на поверхности КТ, что позволяет молекулам тушителя лучше взаимодействовать с наночастицами. Кроме того, профиль тушения люминесценции демонстрирует близкое значение интенсивности люминесценции КТ при концентрации Докс 192 мкМ относительно интенсивности люминесценции КТ при концентрации Докс 92 мкМ в случае КТ, стабилизированных ТГК. Это подтверждает, что с увеличением концентрации антибиотика наблюдается значительный вклад Докс в общую интенсивность люминесценции. По этой причине оптимальным диапазоном концентраций Докс для тушения люминесценции КТ является 2-92 мкМ.

Поскольку биологические жидкости, в частности, плазма крови, имеют сложную матрицу, которая может затруднить процесс определения Докс, оценивали влияние компонентов плазмы крови, на оптические свойства КТ (рисунок 5).

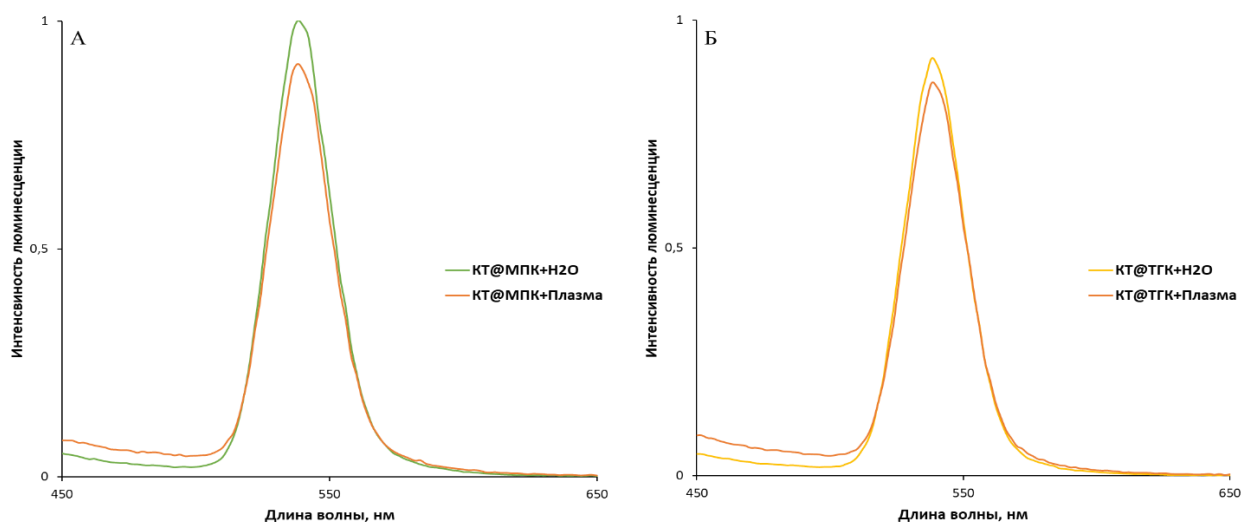


Рисунок 5 – Спектры люминесценции КТ, стабилизированных МПК (А) и ТПК (Б), в присутствии плазмы крови

Выявлено, что добавление плазмы к КТ способствует снижению интенсивности люминесценции наночастиц, что связано с изменением рН и эффектом внутреннего фильтра [10].

Ввиду того, что Докс взаимодействует с компонентами крови, и оптические свойства лекарственного средства и наночастиц изменяются в присутствии плазмы крови, исследовали влияние крови Докс, инкубированного в плазме крови в течение 30 минут, на люминесценцию КТ (рисунок 6).

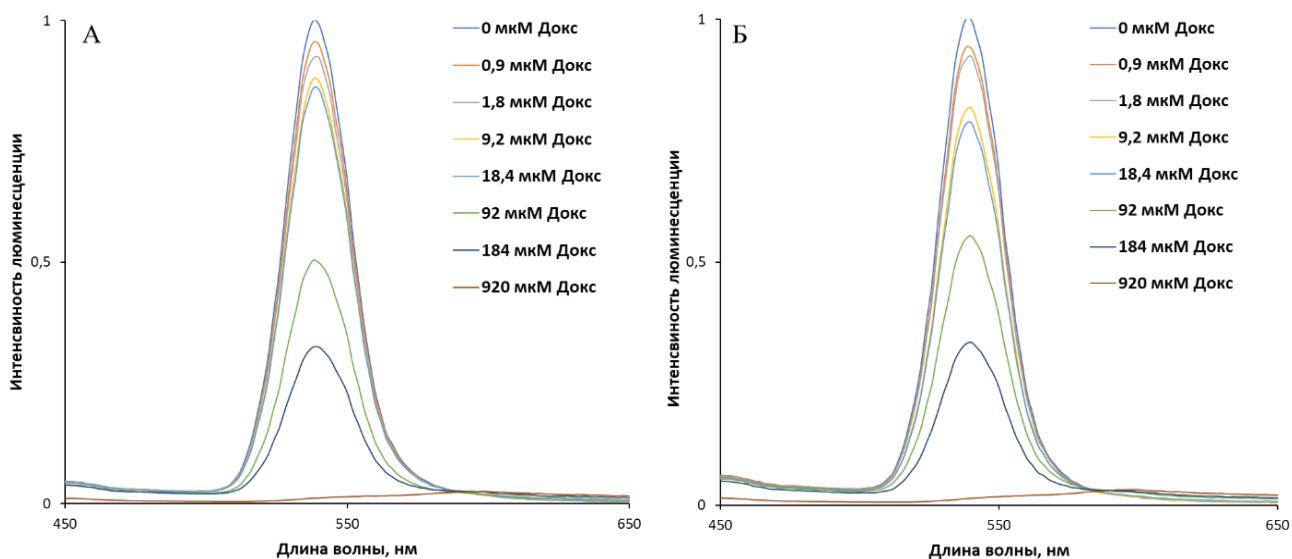


Рисунок 6 – Спектры люминесценции КТ, стабилизированных МПК (А) и ТПК (Б), в присутствии плазмы крови с Докс

Установлено, что в зависимости от концентрации Докс в плазме крови интенсивность люминесценции образцов наночастиц снижается за счет электростатического взаимодействия между Докс и поверхностью КТ, в результате которого энергия безызлучательного перехода снижается в зависимости от концентрации тушителя [12]. Поскольку Докс взаимодействует с белками плазмы крови, количество препарата, взаимодействующего с КТ, может уменьшаться со временем.

Для выявления зависимости изменения интенсивности люминесценции КТ от концентрации Докс в плазме крови построили графики Штерна-Фольмера и профиль тушения люминесценции (рисунок 7).

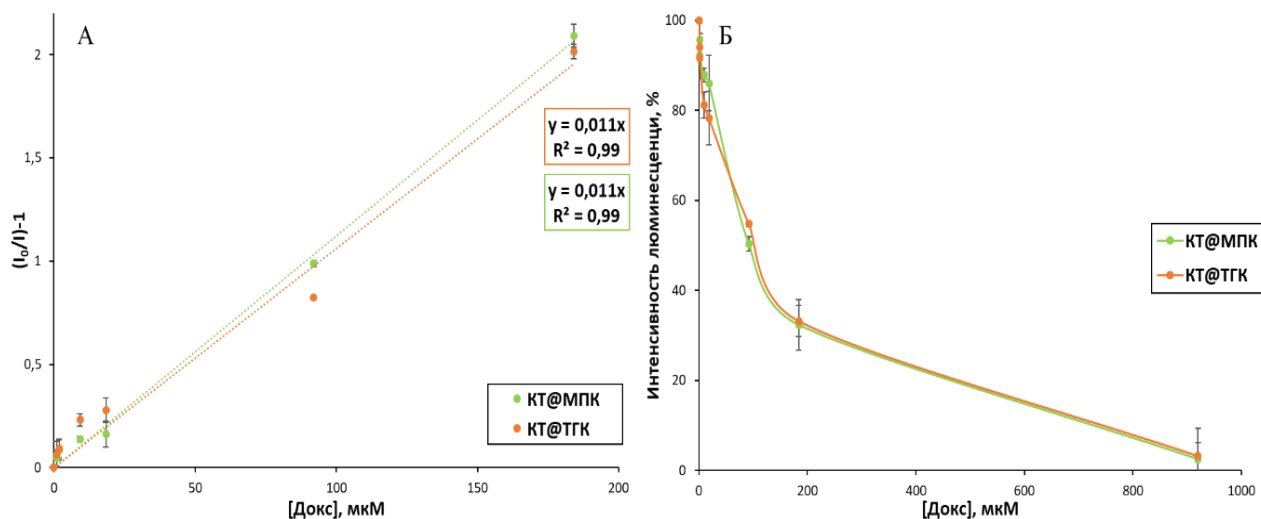


Рисунок 7 – Графики Штерна-Фольмера (А) и профиль тушения люминесценции КТ в присутствии плазмы с Докс (Б)

Константа тушения для образцов составила $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, это может быть обусловлено тем, что инкубирование Докс в плазме крови в течение 30 минут недостаточно для сравнения чувствительности наночастиц, стабилизированных разными модификаторами, с использованием графиков Штерна-Фольмера. Однако профиль тушения люминесценции демонстрирует более выраженное снижение интенсивности люминесценции КТ, стабилизированных ТГК, при концентрациях Докс, равных 0,9-18,4 μM . В случае КТ, стабилизированных МПК, снижение интенсивности люминесценции выражено при концентрациях Докс, равных 92-920 μM [10].

Так как концентрация лекарственного средства в организме пациента снижается со временем [13], и Докс активно связывается с белками крови [14], изучили влияние Докс на люминесценцию КТ после инкубирования препарата в плазме крови в течение 24 часов (рисунок 8).

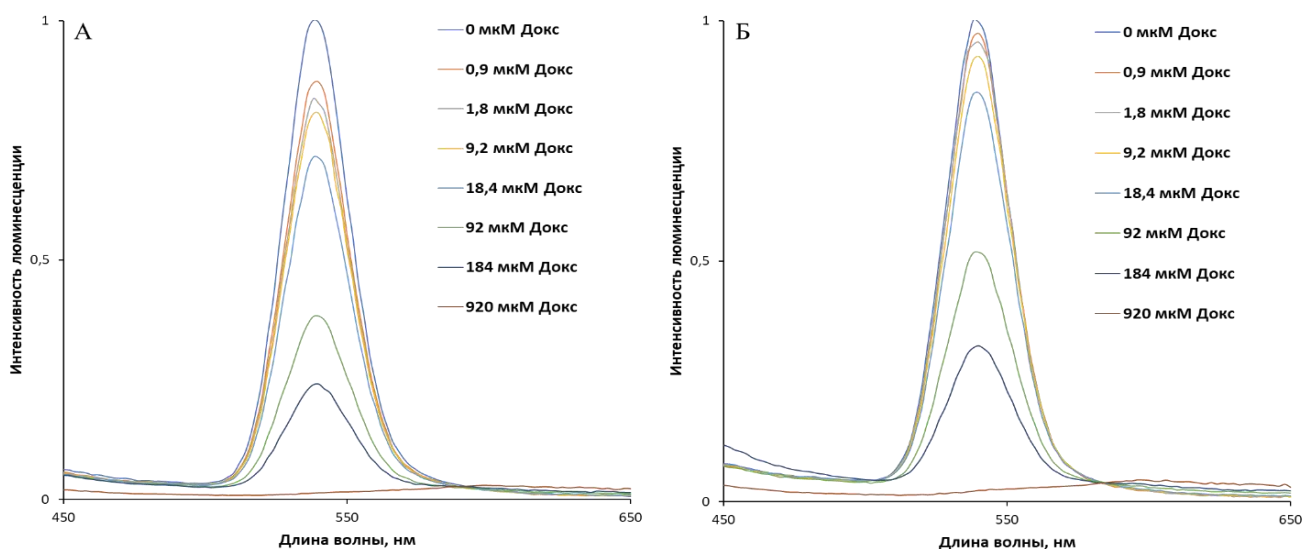


Рисунок 8 – Спектры люминесценции КТ, стабилизированных МПК (А) и ТПК (Б), в присутствии плазмы крови с Докс

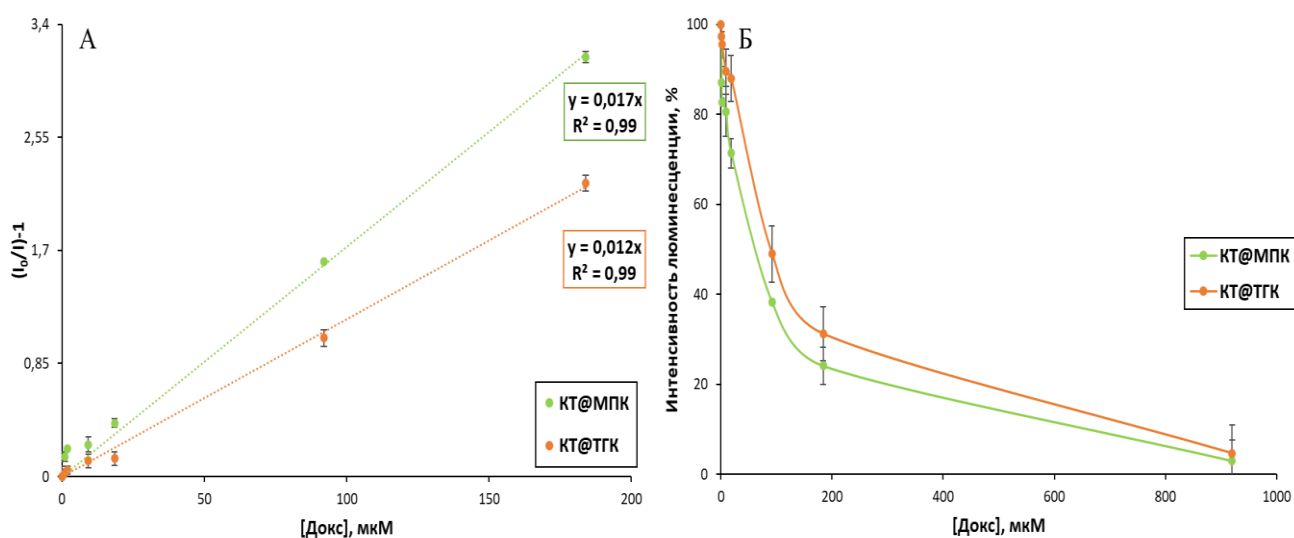


Рисунок 9 – Графики Штерна-Фольмера (А) и профиль тушения люминесценции КТ в присутствии плазмы с Докс (Б)

Из рисунка 9 видно, что константы тушения для КТ, стабилизированных МПК, и КТ, стабилизированных ТПК, имеют разные значения: $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ и $1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ соответственно [10]. Для определения чувствительности приведенных люминесцентных наносенсоров рассчитали предел обнаружения (ПО) (таблица 3).

Таблица 3 – ПО для образцов КТ состава CdZnSeS

Образец КТ	ПО, мкМ
КТ@МПК	0,06
КТ@ТГК	0,15

Выявлено, что КТ, стабилизированные МПК, обладают большей чувствительностью к тушению под действием плазмы с Докс. Такое повышение чувствительности может быть связано с взаимодействием Докс с белками плазмы крови, вследствие чего происходит стабилизация препарата в растворе. Кроме того, наночастицы, стабилизированные МПК, стабильнее во времени, чем КТ, стабилизированные ТГК. Таким образом, длительное инкубирование препарата в плазме крови позволяет приблизиться к условиям мониторинга Докс в биологических жидкостях во время курса химиотерапии, а также повысить чувствительность люминесцентных наносенсоров на основе КТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Модифицировали КТ состава CdZnSeS гидрофильными лигандами (ТГК и МПК). КВ гидрофильных наночастиц составил 61% для образца, стабилизированного ТГК, и 71% для образца, стабилизированного МПК.
2. Изучили влияние вспомогательных компонентов препарата синдроксоцина (лактозы) на люминесценцию КТ. Выявлено, что лактоза в концентрации, сопоставимой с содержанием в препарате, не оказывает влияние на люминесценцию наночастиц.
3. Подобрали оптимальный диапазон концентраций водных растворов Докс для аналитического тушения люминесценции КТ, который составил 2-92 мкМ. КТ, стабилизированные ТГК, обладают большей чувствительностью к тушению люминесценции под действием водных растворов Докс ввиду меньшего размера лигандного слоя.
4. Рассмотрели влияние плазмы крови на оптические свойства КТ. Так, интенсивность люминесценции КТ в присутствии плазмы крови

незначительно снижается, что связано с изменением ионной силы и pH раствора, а также эффектом внутреннего фильтра.

- Исследовали чувствительность образцов КТ при тушении люминесценции Докс в плазме крови человека. ПО для КТ, стабилизированных МПК, составил 0,06 мкМ, а ПО для КТ, стабилизированных ТГК, – 0,15 мкМ. Повышение чувствительности КТ, стабилизированных МПК, с увеличением времени инкубирования препарата в плазме крови может возникать ввиду взаимодействия Докс с белками плазмы крови, вследствие чего происходит стабилизация препарата в растворе. Кроме того, наночастицы, стабилизированные МПК, стабильнее во времени, чем КТ, стабилизированные ТГК.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

- Sikora T. и др. Application of optical methods for determination of concentration of doxorubicin in blood and plasma // *Pharmaceuticals*. – 2022. – Т. 15. – №. 2. – С. 112.
- Speranskaya E. S. и др. Enzyme modulation of quantum dot luminescence: Application in bioanalysis // *TrAC*. – 2020. – Т. 127. – С. 115897.
- Eksborg S. Extraction of daunorubicin and doxorubicin and their hydroxyl metabolites: self-association in aqueous solution // *J. Pharm. Sci.* – 1978. – Т. 67. – №. 6. – С. 782-785.
- Hayakawa E. и др. Visible absorption and proton nuclear magnetic resonance studies on the self-association of doxorubicin in aqueous solution // *Chem. Pharm. Bull.* – 1991. – Т. 39. – №. 4. – С. 1009-1012
- Tasca E. и др. The self-association equilibria of doxorubicin at high concentration and ionic strength characterized by fluorescence spectroscopy and molecular dynamics simulations // *Colloids Surf., A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2019. – Т. 577. – С. 517-522.

6. Skalová Š. и др. Doxorubicin determination using two novel voltammetric approaches: A comparative study // *Electrochim. Acta.* – 2020. – Т. 330. – С. 135180.
7. Raichlin S. и др. Electron-transfer quenching of nucleic acid-functionalized CdSe/ZnS quantum dots by doxorubicin: A versatile system for the optical detection of DNA, aptamer–substrate complexes and telomerase activity // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – Т. 26. – №. 12. – С. 4681-4689
8. Karakoti A. S. и др. Surface functionalization of quantum dots for biological applications // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2015. – Т. 215. – С. 28-45.
9. Moshkov A. S. и др. Hydrophilization parameters influencing the properties of shelled alloyed QDs // *Computational Biophysics and Nanobiophotonics.* – SPIE, 2022. – Т. 12194. – С. 311-317.
10. Mescheryakova S. A. и др. Fluorescent alloyed CdZnSeS/ZnS nanosensor for doxorubicin detection // *Biosensors.* – 2023. – Т. 13. – №. 6. – С. 596.
11. Gao X., Niu L., Su X. Detection of DNA via the fluorescence quenching of Mn-doped ZnSe D-dots/doxorubicin/DNA ternary complexes system // *J. Fluoresc.* – 2012. – Т. 22. – С. 103-109.
12. Raichlin S. и др. Electron-transfer quenching of nucleic acid-functionalized CdSe/ZnS quantum dots by doxorubicin: A versatile system for the optical detection of DNA, aptamer–substrate complexes and telomerase activity // *Biosens. Bioelectron.* – 2011. – Т. 26. – №. 12. – С. 4681-4689.
13. Корман Д. Б. Противоопухолевые препараты, применяемые для лечения злокачественных опухолей органов пищеварения: механизмы действия и фармакокинетика // *НМ Эмануэля РАН.* – 2018.
14. Agudelo D. и др. Probing the binding sites of antibiotic drugs doxorubicin and N-(trifluoroacetyl) doxorubicin with human and bovine serum albumins. – 2012.

