

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

Кафедра биохимии и биофизики

СИНТЕЗ НАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ЗОЛОТЫХ НАНОЗВЁЗД  
ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Олейникова Антона Сергеевича

Научный руководитель:

профессор, док. биол. наук



С.А. Коннова

Научный консультант:

30.05.2024г.

с.п.с. лаборатории нанобиотехнологии ИБФРМ РАН

канд. физ.-мат. наук



В.А. Ханадеев

Заведующий кафедрой:

профессор, док. биол. наук



С.А. Коннова

30.05.2024г.

Саратов 2024

## ВВЕДЕНИЕ

Опухолевые заболевания занимают в мире ведущее место по смертности среди людей. Одним из способов лечения таких заболеваний является химиотерапия – процесс медикаментозного воздействия на опухоль с целью замедлить рост клеток. Однако противораковые лекарства имеют ряд побочных эффектов в виде тошноты, рвоты, потери аппетита, выпадения волос, снижения иммунитета. При использовании более агрессивной химиотерапии может возникать и летальный исход.

С целью сведения к минимуму побочных эффектов противоопухолевых лекарств в настоящее время большой практический интерес представляет адресная доставка лекарств с помощью различных наноносителей. Использование наноносителей для иммобилизации лекарственных препаратов предоставляет возможность улучшить их эффективность и преодолеть различные барьеры в организме.

В настоящее время существует огромное разнообразие таких наноразмерных носителей, однако большой интерес представляют золотые наночастицы (ЗНЧ) и наночастицы на основе кремнезема. ЗНЧ имеют уникальные оптические, термические и химические свойства по сравнению с другими материалами, характеризуются высокой биocomпaтибельностью и улучшенной стабильностью, что позволяет им с легкостью проникать в клетки-мишени и выдерживать высокую лекарственную загрузку.

Наночастицы на основе диоксида кремния также имеют ряд преимуществ. Они используются для переноса и высвобождения лекарственных препаратов в определенное место в организме с контролируемой скоростью высвобождения без ущерба для здоровья пациента. Это достигается благодаря таким свойствам как биодоступность и способность к биологическому разложению. Благодаря этим свойствам кремний может выступать в качестве резервуара для лекарственных препаратов и доставлять их к клеткам-мишеням без преждевременного высвобождения.

Цель работы: синтез наноконтейнеров на основе золотых нанозвёзд (ЗНЗв), используемых для доставки лекарств и проверки их биосовместимости на клеточных линиях *in vitro*.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Синтезировать золотые нанозвёзды с длиной волны плазмонного резонанса, входящей в окно прозрачности биологической ткани;
2. Покрыть нанозвёзды толстой оболочкой из органического диоксида кремния;
3. Провести травление оболочки из органического диоксида кремния;
4. Проверить наноконтейнеры на цитотоксичность на клеточной линии *in vitro* на цитотоксичность.

Бакалаврская работа состоит из введения, трех глав основной части (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение), заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы написан на основе анализа 57 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: Виды наноносителей для доставки лекарственных препаратов: преимущества и недостатки; Золотые наночастицы: свойства и биомедицинское применение: Биораспределение и токсичность золотых наночастиц.

**Основное содержание работы.** На первом этапе исследования был выполнен синтез коллоидного золота. Были приготовлены растворы добавляемых реагентов, синтезированы золотые нанозвёзды, которые далее были покрыты толстой оболочкой ( $190 \pm 10$  нм) из органического диоксида кремния. После чего провели травление оболочки для создания полости внутри нанокompозита.

Коллоидное золото синтезировали путем цитратного восстановления золотохлористоводородной кислоты по методу Френса. Суть этого метода заключалась в следующем: к кипящему водному раствору ЗХВК с концентрацией 0,01% приливали водный раствор цитрата натрия. Причем количество соли добавляли в зависимости от размера частиц, который нам

нужен. Уравнение реакции восстановления ЗХВК с помощью цитрата натрия выглядит следующим образом:



Для более точного определения размера коллоидного золота, как правило, используют методы электронной микроскопии, однако для сравнения мы решили вместе с ПЭМ использовать спектрофотометрический метод определения, который основан на зависимости пика поглощения света коллоидного золота от его размера.

Были получены ПЭМ-изображения (рисунок 1а) и спектры поглощения коллоидного золота (рисунок 1б). Судя по пику плазмонного резонанса на 524 нм, размер коллоидного золота составил 25 нм. По ПЭМ-изображениям видно, что большинство наночастиц были одинаковыми по размеру, однако встречались и крупные частицы вытянутой формы. Один из недостатков метода Френса заключается в том, что чем крупнее наночастицы нужно синтезировать, тем сложнее контролировать их размер. В результате чего могут получиться наночастицы более вытянутой формы и крупного размера.

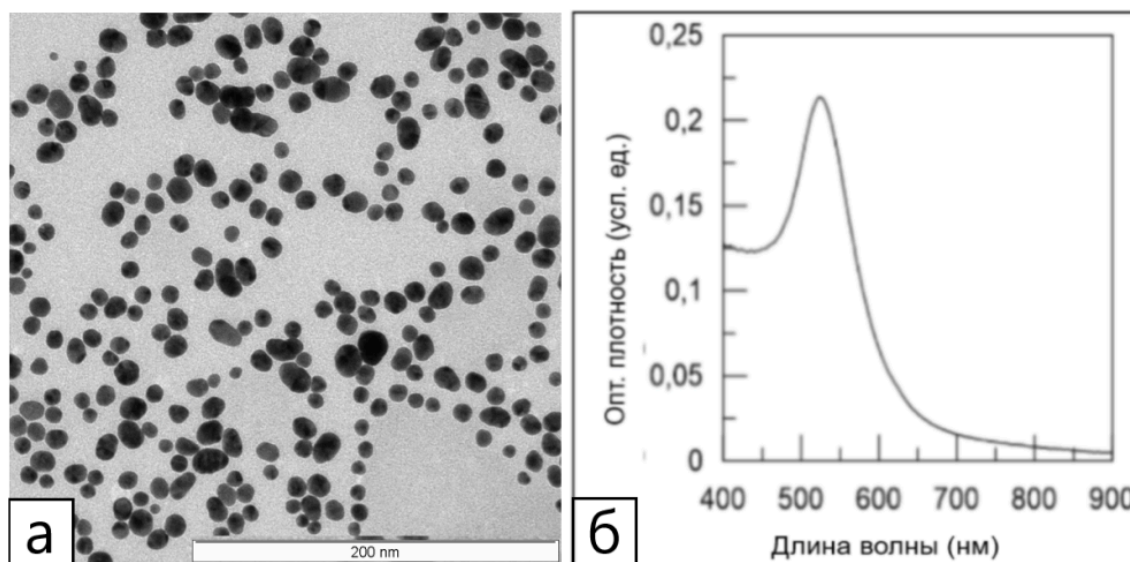


Рисунок 1 – ПЭМ-изображение (а) и спектр поглощения (б) коллоидного золота. Длина масштабного отрезка составляет 200 нм.

Однако такая неоднородность наночастиц никак не повлияла на дальнейший синтез золотых нанозвезд, так как плазмонный резонанс ЗНЗв

контролируется длиной шипов, которые формируются благодаря добавлению в реакционную смесь нитрата серебра, соляной и золотохлористоводородной кислот. Согласно литературным данным, с увеличением концентрации соляной кислоты длина шипов уменьшается, что будет существенно влиять на спектральное положение ПР.

Таким образом, при добавлении 1,05 мл раствора соляной кислоты и 5,25 мл раствора нитрата серебра с концентрациями 1 М и 4 мМ соответственно, нам удалось синтезировать золотые нанозвёзды с настройкой плазмонного резонанса  $> 900$  нм. Спектры поглощения ЗНЗв представлены на рисунке 2. По спектру видно, что длинноволновый ПР настроен на 950 нм. Настройка поверхностного плазмонного резонанса на такие длинноволновые значения важна для биомедицинских применений.

Именно это значение ПР находится в диапазоне от 700 до 1000 нм, что соответствует первому биологическому окну прозрачности – спектральному диапазону, в котором ткани становятся частично прозрачными из-за одновременного снижения поглощения и рассеяния. Благодаря этому полученные наноконпозиты возможно будет использовать в дальнейших исследованиях не только как контейнеры для доставки лекарств, но и в фототермической и фотодинамической терапии.

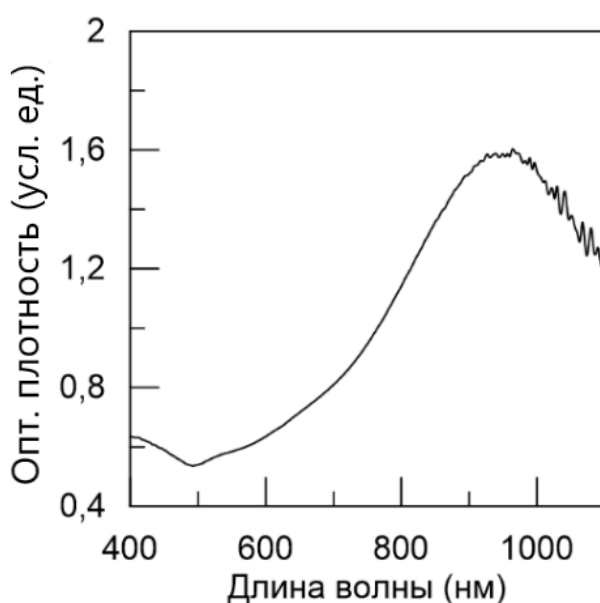


Рисунок 2 – Спектр поглощения образца золотых нанозвёзд.

Этот образец был нанесен на ПЭМ-сеточки. ПЭМ-изображения представлены на рисунке 3. Нам удалось синтезировать ЗНЗв со средним диаметром ядра  $87,5 \pm 7,5$  нм и средней длиной шипов  $65 \pm 10,4$  нм.



Рисунок 3 – ПЭМ-изображение образца золотых нанозвезд, масштабный отрезок – 200 нм.

На следующем этапе полученные золотые нанозвезды были покрыты оболочкой из органического диоксида кремния. Перед покрытием была проведена стабилизация тиолированным полиэтиленгликолем (SH-PEG-COOH), так как при отсутствии пэгилирования наблюдалось выпадение наносфер в осадок с дальнейшей агрегацией. Поэтому, перед тем как покрыть образец органическим кремнием, ЗНЗв были стабилизированы SH-PEG-COOH для предотвращения агрегации нанозвезд.

Спектр экстинкции представлен в виде графика (рисунок 4). Судя по интенсивному коротковолновому плечу, вокруг золотых нанозвезд образовалась толстая оболочка ( $190 \pm 10$  нм) из органического диоксида кремния. После двух отмывок от побочных продуктов реакции и разведений образца в воде пик спектра экстинкции и оптическая плотность изменились незначительно, потери наночастиц составили около 5%.

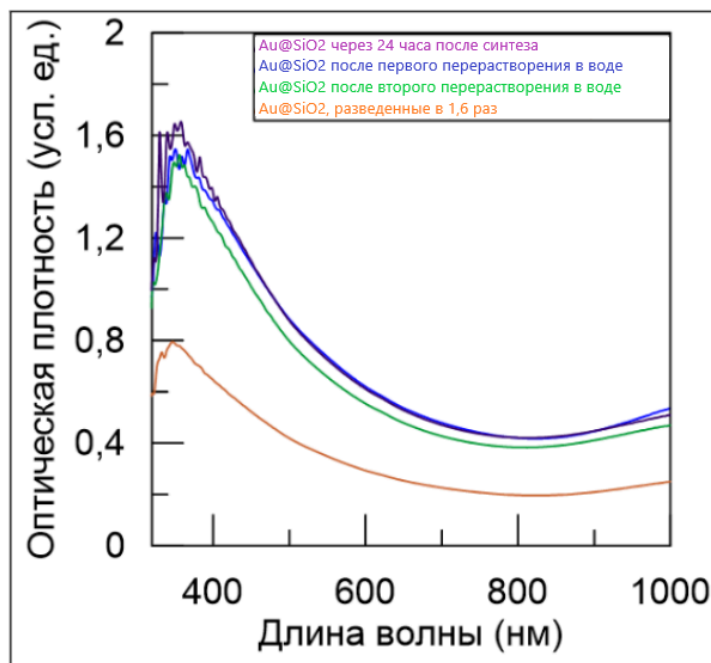


Рисунок 4 – Спектры экстинкции золотых нанозвёзд, покрытых оболочкой из органического диоксида кремния.

Исходная концентрация золотых нанозвёзд составляла 94,34 мкг/мл. После концентрирования образца в 1,6 раз концентрация нанозвёзд составила 150,9 мкг/мл. С учетом 5% потерь наночастиц при отмывке от реагентов концентрация составила 143,36 мкг/мл. Для теста образца на цитотоксичность использовали начальную концентрацию 25 мкг/мл, поэтому образец разбавили в 5,7 раз, чтобы добиться нужной концентрации.

Таким образом, конечная концентрация наноконтейнеров на основе золотых нанозвёзд, покрытых оболочкой из органического диоксида кремния, составила 25 мкг/мл. Полученный образец был нанесен на ПЭМ-сеточки (рисунок 5).

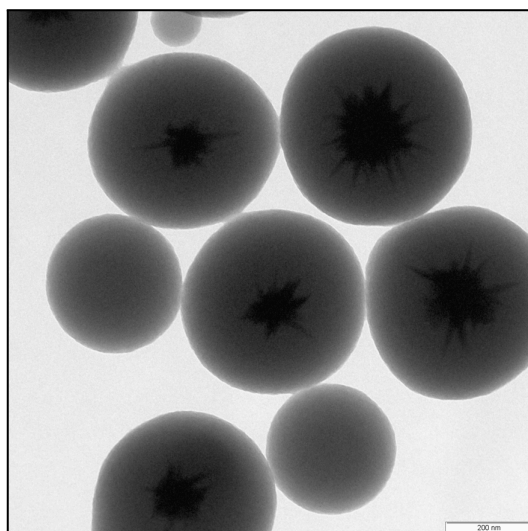


Рисунок 5 – ПЭМ-изображение золотых нанозвёзд, покрытых оболочкой из органического диоксида кремния, масштабный отрезок – 200 нм.

В результате травления оболочки из органического диоксида кремния получили ПЭМ-изображение и спектры экстинкции (рисунок 6). Спустя 60 минут после травления максимум спектра поглощения снизился на 50% по сравнению с первым измерением. Это свидетельствует о том, что произошло протравливание оболочки и образование полости в нанокompозите. Полученное ПЭМ-изображение демонстрирует случай максимального травления оболочки и образования внутри нанокompозита полости.

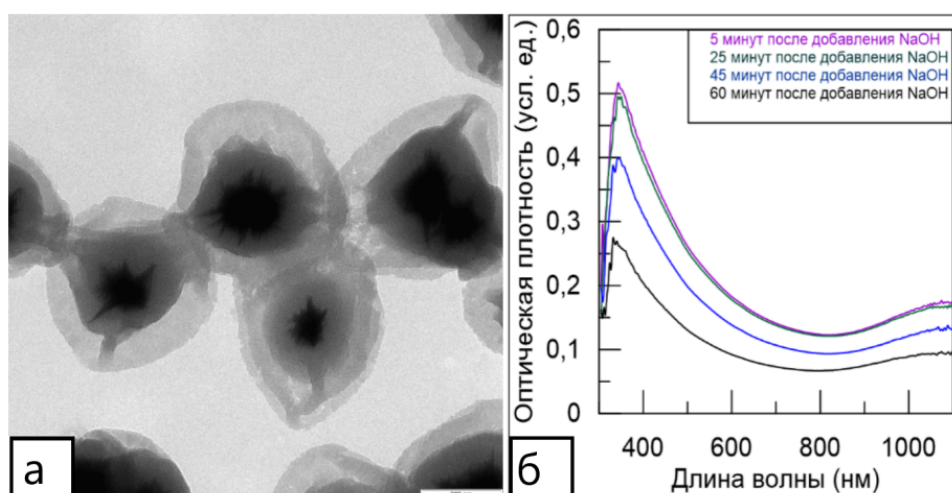


Рисунок 6 – ПЭМ-изображение травления оболочки спустя 60 минут, масштабный отрезок 200 нм (а) и спектры экстинкции травления оболочки из органического диоксида кремния спустя 5, 25, 45, 60 минут после добавления NaOH (б).



Для проверки возможности использования в биомедицине синтезированных наноконтейнеров на основе золотых нанозвёзд для доставки лекарственных средств они были проверены на цитотоксичность. На рисунке 7 представлены результаты оценки метаболической активности на клеточных линиях яичника китайского хомячка СНО II после 72-х часовой инкубации с полученными наноконтейнерами.

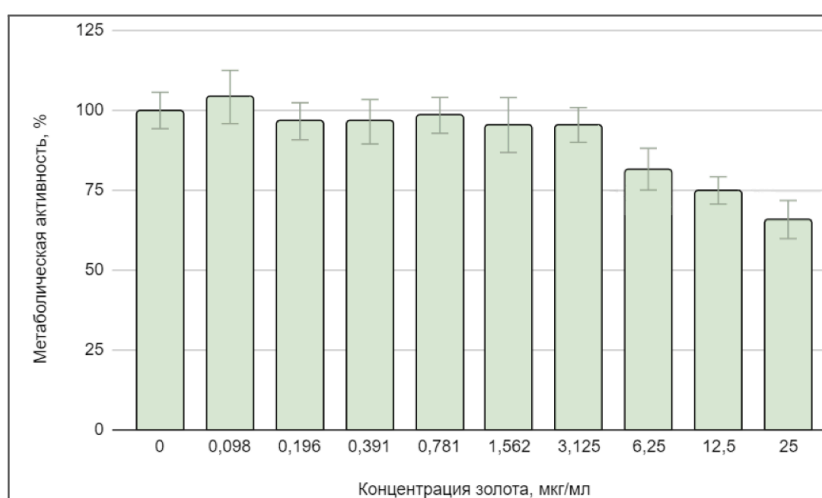


Рисунок 7 – Оценка метаболической активности клеточной линии яичника китайского хомячка (СНО II) после 72-х часовой инкубации с наноконтейнерами на основе золотых нанозвёзд.

После проверки СНО II на жизнеспособность клеток было обнаружено, что в результате инкубации клеток с наноконтейнерами в диапазоне концентраций от 0,1 до 3,13 мкг/мл наблюдалась высокая метаболическая активность, свидетельствующая об отсутствии цитотоксического эффекта наноконтейнеров на клеточную линию. Однако в диапазоне концентраций от 6,25 до 25 мкг/мл МА снижалась до  $65 \pm 9,2\%$ . Согласно литературным данным, порог цитотоксичности составляет 70%, что говорит о слабой токсичности полученных нами наноконтейнеров в исследуемом диапазоне концентраций (от 6,25 до 25 мкг/мл).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря своим уникальным физико-химическим и оптическим свойствам золотые наночастицы находят широкое применение в

биомедицинских исследованиях, особенно в качестве наноконтейнеров для доставки лекарств. Кроме того, преимуществами ЗНЗв перед другими нанокompозитами являются их простота синтеза, фотостабильность, что делает их незаменимым инструментом в адресной доставке лекарств.

В последнее десятилетие нанотехнологии стали активно использоваться в медицинской сфере, открыв новые горизонты для диагностики и лечения различных заболеваний. Однако, несмотря на значительный прогресс в этой области, ключевым вопросом остаётся безопасность применения наноматериалов. Перед внедрением в практику необходимо тщательно изучить их биораспределение и токсичность. Особое внимание следует уделить оценке цитотоксичности, генотоксичности, распределению в органах и тканях, а также иммуногенности. Только комплексный подход позволит минимизировать риски и обеспечить эффективность использования нанотехнологий в медицине.

Поэтому в ходе исследования полученные наноконтейнеры проверяли на цитотоксичность на здоровых клеточных линиях *in vitro*. Полученные результаты являются основой для их дальнейшего использования в биомедицинских исследованиях в качестве нанотранспортеров, участвующих в таргетной доставке лекарств.

## ВЫВОДЫ

1. Методом зародышевого роста с использованием соляной кислоты и нитрата серебра синтезированы золотые нанозвёзды (ЗНЗв) с величиной плазмонного резонанса 950 нм, входящего в диапазон первого биологического окна прозрачности. Средний диаметр ядра составлял ядра  $87,5 \pm 7,5$  нм, а средняя длина шипов –  $65 \pm 10,4$  нм.
2. Полученные нанозвёзды покрыты толстой оболочкой из органического диоксида кремния, со средней толщиной  $190 \pm 10$  нм.
3. Путем протравливания оболочки получены нанокompозиты содержащие внутри полость, предназначенную для загрузки лекарств.

4. Исследована цитотоксичность полученных наноконтейнеров в отношении линии клеток СНО II. Установлено, что наноконтейнеры в диапазоне концентраций от 0,1 до 3,13 мкг/мл являются нетоксичными, однако в диапазоне от 6,25 до 25 мкг/мл наблюдается снижение метаболической активности вплоть до  $65 \pm 9,2\%$ .

