

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра Оптики и биофотоники

**Спектрально-кинетические исследования процессов плазмон –
индуцированной передачи электронной энергии в комплексах
биобъектов и наночастиц металлов в ультрафиолетовом диапазоне**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 2224 группы
направления (специальности) 03.04.02 Физика
Институт физики
Демишкевич Елизаветы Александровны

Научный руководитель
д.ф.-м.н., профессор
должность, уч. степень, уч. звание


21.06.23
дата, подпись

В.И.Кочубей
инициалы, фамилия

Заведующий кафедрой
д.ф.-м.н., профессор, чл.-корр РАН
должность, уч. степень, уч. звание


21.06.23
дата, подпись

В.В.Тучин
инициалы, фамилия

Саратов, 2023 год

Введение. Данная работа посвящена спектрально – кинетическим исследованиям плазмон – индуцированной передачи электронной энергии в комплексах ароматических аминокислот и наночастиц металлов родия в ультрафиолетовом диапазоне. Стремление изучать органические объекты приводит к повышенному интересу со стороны ученых к ультрафиолетовой плазмонике, который постоянно растет.

Важным условием снижения смертности населения от ССЗ является проведение эффективной кардиоваскулярной профилактики [1]. В основе патогенеза многих ССЗ лежит атеротромбоз – адгезия и агрегация тромбоцитов на месте нестабильной атеросклеротической бляшки с образованием внутрисосудистого тромба, обуславливающего фатальные осложнения ИБС (инфаркт миокарда, острый коронарный синдром, острое нарушение мозгового кровообращения, критическую ишемию нижних конечностей) [2].

Активация тромбоцитов – ключевой момент в патогенезе сердечно-сосудистых осложнений, поэтому максимально полноценное подавление тромбоцитарного звена является важнейшей задачей в ходе лечения и профилактики осложнений.

Работа имеет высокую социальную значимость и актуальность, поскольку тромбоциты участвуют во многих процессах организма человека и играют главную роль в сердечно – сосудистых заболеваниях (ССЗ) [3].

Ингибирование тромбоцитарной агрегации является в настоящее время ключевым терапевтическим подходом в лечении и профилактике ССЗ атеросклеротического генеза. Крайне важно, чтобы антитромбоцитарные воздействия были не только мощными, но и работали в течение достаточно долгого времени [4]. Эффективность современной антитромбоцитарной терапии (АТ) недостаточно высока. Прием одного антитромбоцитарного препарата (АП), например, аспирина снижает риск развития инфаркта миокарда (ИМ) только на 20-31%, ишемического инсульта на 22% [5].

Ароматические аминокислоты, а именно: тирозин, триптофан и фенилаланин входят в состав тромбоцитов, которые являются основной компонентой крови человека. Стоит упомянуть, что в 2020 году были опубликованы результаты исследования, в котором говорится о возможности регистрации состояния тромбоцитов по спектрах КРС [4]. В статье обозначены и описаны изменения интенсивностей компонент тромбоцитов, в том числе и в ароматических аминокислотах (тирозин, триптофан и фенилаланин) при наступлении патологий.

Научная новизна работы заключается в исследовании нового подхода обнаружения тромбоцитарных изменений с помощью спектрофлуорометрии.

Целью данной работы является исследование возможности определения изменений в тромбоцитах по спектрам люминесценции. Ввиду того, что физиологические концентрации ароматических аминокислот являются малыми, используемым методом является регистрация люминесценции в присутствии наночастиц благородных металлов так как, ожидается, что эффект ближнего поля должен увеличивать интенсивность люминесценции.

В рамках данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методику синтеза наночастиц родия.
2. Определить размеры и оптические свойства, а также дзета – потенциал полученных наночастиц родия.
3. Исследовать спектральные и время-разрешенные параметры аминокислоты в комплексе с НЧ родия.

В работе используются следующие методы исследования: спектрофотометрия для определения максимума плазмонного поглощения синтезированных наночастиц, фотонная корреляционная спектроскопия (ФКС) для определения гидродинамического радиуса полученных наночастиц, а также спектрофлуорометрия для исследования интенсивности люминесценции аминокислот в комплексе с наночастицами родия.

Объем магистерской работы составляет 74 страницы и включает в себя 25 рисунков, 4 таблицы, 108 источников. Работа состоит из введения, трех глав (Литературный обзор, Материал и методы, Результаты), заключения и библиографии.

Основное содержание работы. Введение и первая глава дают достаточное описание применения наночастиц родия в фундаментальных биофизических и практических исследованиях, а также механизмы переноса энергии между металлической наночастицей и биомолекулой, а именно: FRET, NSET, PRET(PIRET), MEF, SERS. Представлен подробный обзор существующих методик химического, физического и зеленого синтеза наночастиц родия. Отдельным пунктом в литературном обзоре также выделено описание применения комбинационного рассеяния света и металл-усиленной флуоресценции для медицинских исследований. Показано, что такие методы как SERS и MEF являются перспективными для исследования различных биологических объектов, которые важны для медицины и биохимии. С использованием данных методов были исследованы такие биологические аналиты, как АТФ, антибиотики (тетрациклин, ципрофлоксацин, энрофлоксацин, и ломефлоксацин), белки (стрептавидин, миоглобин, фикобилипротеин, тропонин I, кофилин-1, интерлейкина-6, рекомбинантный гемагглютинин белка rHA, альфа-фетальный белок (АФП), а также ароматические аминокислоты (тирозин, триптофан), которые входят в состав тромбоцитов.

В первой главе также присутствует подробное описание тромбоцита человека, его строение, функции и роль в процессе тромбообразования. Указано, что тромбоциты многофункциональны и участвуют во многих патофизиологических процессах. При повреждении стенки сосуда тромбоциты играют важную роль в таких процессах как адгезия, реакции высвобождения, агрегация, обнажение прокоагулянтной поверхности, образование микрочастиц и ретракция сгустка. В главе приводится детальное описание рецептора P2Y₁₂. Описано, что данный рецептор состоит из 342

аминокислот, включая флуоресцирующие в УФ-диапазоне ароматические аминокислоты, а именно: тирозин, триптофан и фенилаланин, которые являются целевым для практического применения полученных результатов.

Вторая глава посвящена описанию материалам и методам, которые были использованы в данной работе. В рамках данной работы была разработана методика химического синтеза родиевых наночастиц. Описан алгоритм подготовки образцов ароматических аминокислот в диапазоне концентраций 10^{-2} - 10^{-7} М. Представлено подробное описание проведенных экспериментов как для определения оптических свойств синтезированных наночастиц родия с использованием спектрофотометрии, так и для определения среднего гидродинамического радиуса методом фотонной корреляционной спектроскопии. В работе также присутствует подробное описание эксперимента с использованием спектрофлуориметра RF-5301PC (Shimadzu, Япония) для исследования влияния присутствия наночастиц родия на интенсивность флуоресценции ароматических аминокислот. Указано, что в рамках эксперимента использовались несколько длин волн возбуждения, а именно: $\lambda = 280$ нм, $\lambda = 270$ нм и $\lambda = 260$ нм для триптофана, тирозина и фенилаланина соответственно, а также $\lambda = 220$ нм для каждой из аминокислот.

Третья глава представляет основные результаты работы. Сначала приведены оптические и морфологические характеристики синтезированных наночастиц родия. Показано, что поглощение полученных НЧ родия находится в УФ - диапазоне, выраженный пик плазмонного резонанса находится при длине волны $\lambda = 214$ нм, а средний гидродинамический радиус равен 38,73 нм. Затем представлены формулы, которые были использованы для коррекции полученных спектров люминесценции ароматических аминокислот в присутствии наночастиц родия.

В данной главе отображены полученные зависимости интенсивности люминесценции каждой ароматической аминокислоты. Объяснено, что переноса энергии при возбуждении в длинноволновых полосах отсутствует,

так как эти полосы не пересекаются с полосой поглощения наночастиц. В предположении диполь-дипольного переноса энергии одним из факторов, определяющих эффективность переноса, является интеграл перекрытия полос. В данном случае он равен нулю, то есть перенос отсутствует. Поэтому представленные зависимости, которые получены при использовании данных длин волн возбуждения не демонстрируют явной тенденции уменьшения или увеличения значений интенсивности люминесценции аминокислот.

Коротковолновые полосы поглощения аминокислот, соответствующие π - π^* переходу на уровень S_2 , перекрываются с полосой поглощения наночастиц, следовательно, можно ожидать наличие переноса энергии. Перенос подтверждается в проведенных экспериментах. Однако, для тирозина и фенилаланина наблюдается усиление люминесценции, а для триптофана – тушение (рис. 1-3).

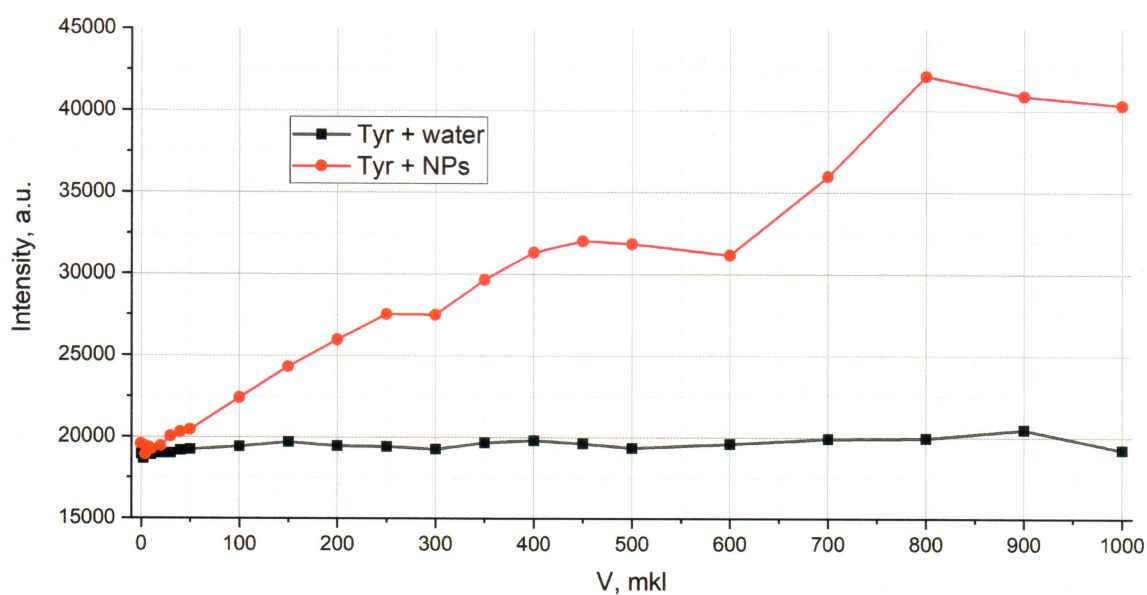


Рис.1 Зависимость интенсивности флуоресценции тирозина от разбавления НЧ родия и дистиллированной воды в диапазоне объемов 0-1000 МКЛ.

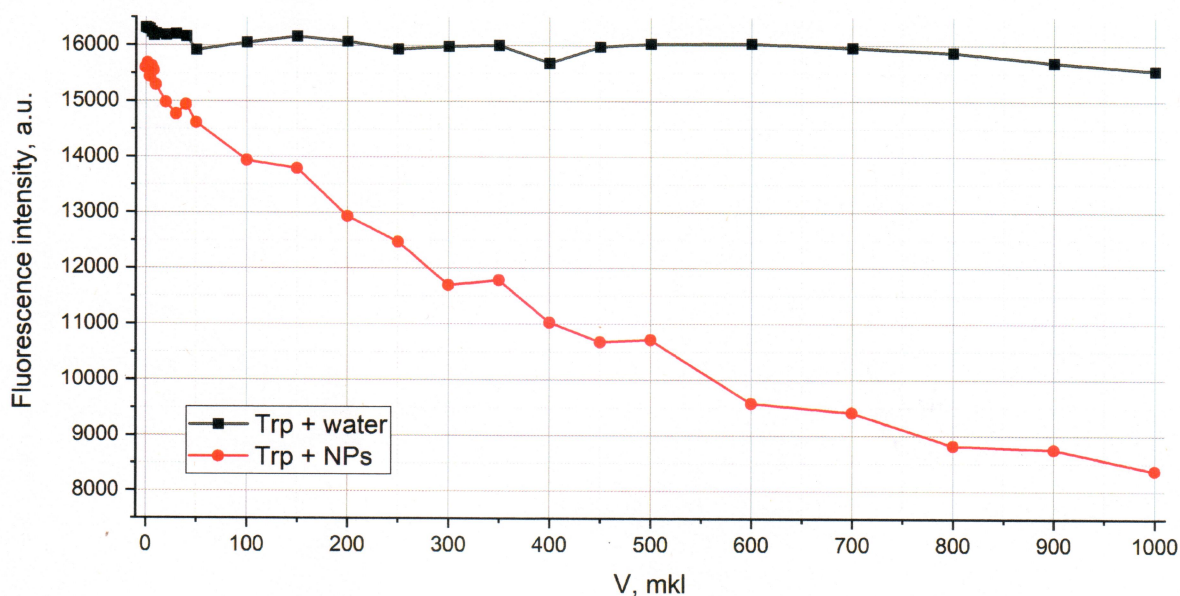


Рис.2 Зависимость интенсивности флуоресценции триптофана от разбавления НЧ родия и дистиллированной воды в диапазоне объемов 0-1000 МКЛ.

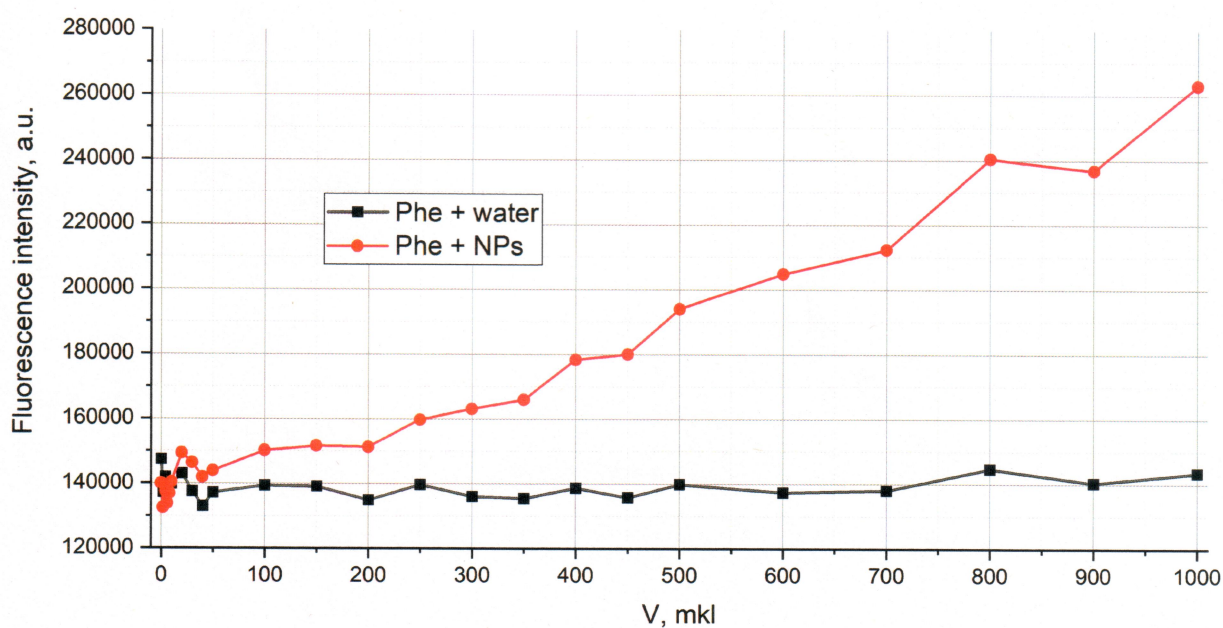


Рис.3 Зависимость интенсивности флуоресценции фенилаланина от разбавления НЧ родия и дистиллированной воды в диапазоне объемов 0-1000 МКЛ.

Такое явление может объясняться различием в структуре аминокислот: в состав тирозина и фенилаланина входит фенольное кольцо, а в состав триптофана – индольное, причем переходы при поглощении происходят

именно в кольце. Для триптофана хорошо известны фотоиндуцированные процессы, такие, как протонирование или фотоионизация, приводящие к тушению люминесценции. В случае наличия в окружении триптофана металлических наночастиц, например, серебра, может происходить фотоиндуцированный перенос электрона на наночастицу.

В третьей главе также представлены результаты расчета констант переноса энергии между наночастицей родия и каждой аминокислотой. Для расчета были выбраны данные, в которых прослеживается явное усиление или уменьшение значений интенсивности люминесценции аминокислот. Константы переноса энергии были посчитаны с использованием уравнения Штерна-Фольмера (таблица 1).

Таблица 3.3.4. Константы переноса энергии между НЧ родия и аминокислотой.

Аминокислота	Константа переноса энергии, M^{-1}	Погрешность измерения, M^{-1}
Тирозин	$-1,38 \cdot 10^{12}$	$8,81 \cdot 10^{10}$
Триптофан	$1,26 \cdot 10^{12}$	$2,26 \cdot 10^{10}$
Фенилаланин	$-6,88 \cdot 10^{11}$	$2,31 \cdot 10^{10}$

Показано, что константы переноса для аминокислот, у которых наблюдалось увеличение значений интенсивности люминесценции отрицательные. В таком случае это означает, что перенос энергии происходит от НЧ родия на аминокислоту. Прямая линейной аппроксимации у тирозина обладает большим углом наклона по отношению к оси абсцисс, поэтому и значение константы переноса энергии по модулю выше, чем фенилаланина. Линейная аппроксимация триптофана демонстрирует восходящий характер, а константа переноса энергии является

положительной, что говорит о том, что перенос энергии происходит от молекул триптофана на НЧ родия.

Заключение. В результате работы были проведены спектрально-кинетические исследования процессов плазмон – индуцированной передачи электронной энергии в комплексах биобъектов и наночастиц металлов в ультрафиолетовом диапазоне. В качестве исследуемых объектов были выбраны ароматические аминокислоты: тирозин, триптофан и фенилаланин, которые входят в состав клеток крови человека, а именно – тромбоцитов. В процессе работы были реализованы следующие задачи:

1. Разработана и осуществлена методика химического синтеза сферических наночастиц родия.
2. Размеры полученных наночастиц родия были исследованы с помощью фотонной корреляционной спектроскопии. Показано, что средний гидродинамический радиус НЧ равен 38,73 нм. Оптические свойства полученных НЧ были исследованы с помощью спектрофотометрии. Показано, что поглощение полученных НЧ родия находится в УФ - диапазоне, выраженный пик плазмонного резонанса находится при длине волны $\lambda=214$ нм.
3. Экспериментально получены и откорректированы спектры люминесценции ароматических аминокислот в присутствии НЧ родия с использованием длины волны возбуждения соответствующей максимуму поглощения аминокислот ($\lambda=260$ нм для фенилаланина, $\lambda=270$ нм для тирозина и $\lambda=300$ нм для триптофана). Построены зависимости интегральной интенсивности люминесценции ароматических аминокислот. Определено, что с использованием данных длин возбуждения не происходит диполь-дипольный перенос энергии между НЧ родия и исследуемыми аминокислотами. Эффект объяснен отсутствием перекрытия полос поглощения аминокислот и плазмонного резонанса.

4. Экспериментально получены и откорректированы спектры люминесценции ароматических аминокислот в присутствии НЧ родия с использованием длины волны возбуждения равной $\lambda=220$ нм для каждой аминокислоты. Построены зависимости интегральной интенсивности люминесценции ароматических аминокислот. Определено, что с использованием данной длины волны возбуждения происходит перенос энергии между НЧ родия и исследуемыми аминокислотами. Показано, что значение интенсивности люминесценции тирозина и фенилаланина увеличивается при добавлении НЧ родия, данные ароматические аминокислоты являются акцепторами энергии. В работе также показано, что с использованием данной длины волны возбуждения значение интенсивности люминесценции триптофана уменьшается при добавлении НЧ родия. В таком случае, можно говорить, что триптофан является донором энергии.
5. Рассчитаны константы переноса энергии для каждой аминокислоты с использованием уравнения Штерна - Фольмера. Значения констант переноса энергии для тирозина и фенилаланина являются отрицательными и равны $-1,38 \cdot 10^{12} \text{ М}^{-1}$ и $-6,88 \cdot 10^{11} \text{ М}^{-1}$ соответственно. Значение константы переноса энергии для триптофана является положительной и равна $1,26 \cdot 10^{12} \text{ М}^{-1}$.

Литература

1. Бокерия Л. А., Ревитшвили А. Ш., Неминуций Н. М. Имплантируемые кардиовертеры-дефибрилляторы-основной метод профилактики внезапной сердечной смерти //Инновационная медицина Кубани. – 2017. – Т. 5. – №. 1. – С. 49-56
2. Basman C. et al. Antiplatelet and anticoagulation therapy during percutaneous coronary interventions: A review for the interventionalist //Journal of Interventional Cardiology. – 2018. – Т. 31. – №. 5. – С. 693-704
3. Искаков Е. Б. Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний //Медицина и экология. – 2017. – №. 2 (83). – С. 19-28
4. Casscells W., Naghavi M., Willerson J. T. Vulnerable atherosclerotic plaque: a multifocal disease //Circulation. – 2003. – Т. 107. – №. 16. – С. 2072-2075
5. Baigent C. et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials //Lancet. – 2009. – Т. 373. – №. 9678. – С. 1849-1860
6. Zyubin A. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy for antiplatelet therapy effectiveness assessment //Laser Physics Letters. – 2020. – Т. 17. – №. 4. – С. 045601.