

На правах рукописи

**ЗЮБИН Андрей Юрьевич**

**СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ С УЧАСТИЕМ МОЛЕКУЛ  
КРАСИТЕЛЕЙ И БИОМОЛЕКУЛ В ПРИСУТСТВИИ  
НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА**

**01.04.05 — Оптика**

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Калининград  
2018

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»

Научный руководитель: кандидат физико-математических наук, доцент,  
ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет  
имени Иммануила Канта»  
**Самусев Илья Геннадьевич**

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор ка-  
федры молекулярной биофизики и физики полимеров  
физический факультета ФГАОУ ВО «Санкт-  
Петербургский государственный университет»  
**Касьяненко Нина Анатольевна**  
доктор химических наук, профессор кафедры физики  
физико-технического института ФГБОУ ВО «Саратов-  
ский государственный технический университет имени  
Гагарина Ю.А.»  
**Мельников Геннадий Васильевич**

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Оренбургский государственный универ-  
ситет»

Защита диссертации состоится «28» июня 2018 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании дис-  
сертационного совета Д 212.232.45 по защите докторских и кандидатских диссертаций  
при Санкт-Петербургском государственном университете по адресу:  
198504, Санкт-Петербург, Петродворец, Ульяновская ул. 1, малый конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Горького СПбГУ по  
адресу:  
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9.  
Диссертация и автореферат размещены на сайте [www.spbu.ru](http://www.spbu.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
Д 212.232.45  
доктор физ.-мат. наук, доцент

Сухомлинов В.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В последние десятилетия методы флуоресцентной и колебательной спектроскопии, применяемые для исследования вещества являются универсальным и чувствительным инструментом для решения задач исследований структуры биомолекул [1–3].

С другой стороны, в исследованиях биомолекул активно применяются плазмонные материалы, созданные на базе благородных металлов и меди, обладающие специфическими оптическими свойствами [4-6]. Данные материалы активно внедряются в методики колебательной и флуоресцентной спектроскопии, используемые для диагностики биомолекул [7, 8]. Особый интерес представляет применение флуоресцентных и колебательных методик в исследованиях молекулярных систем и объектов нанометрового масштаба с использованием диполь-дипольных обменных энергетических процессов и явления плазмонного резонанса для анализа малых концентраций и единичных биомолекул.

Однако, несмотря на активное применение оптических методов исследований для изучения широкого спектра модельных химических соединений и биомолекул, существует значительный интерес, как к применению уже имеющихся результатов теоретических и экспериментальных исследований, так и выявлению новых закономерностей и к разработке новых методов, для практического изучения биомолекул при наступлении различных патологий [9-12].

Данная диссертационная работа направлена на:

А) Экспериментальное изучение фотофизических процессов поглощения, флуоресценции, комбинационного рассеяния, с последующей оценкой энергетического обмена между наночастицами (НЧ) серебра и молекулами красителей в модельных средах - пленках поливинилового спирта (ПВС), в том числе помещенных на шероховатых поверхностях стекла, допированных НЧ серебра.

Б) Практическое применение методов флуоресцентной и колебательной спектроскопии, с использованием результатов модельных исследований, для анализа структуры и оптических свойств биомолекул при наступлении патологии, включая разработку новых оптических методик и подбор экспериментальных условий для исследования биомолекул, в том числе короткоживущих.

**Цель работы** заключается в экспериментальном и теоретическом изучении фотофизических процессов с участием НЧ серебра, биомолекул и красителей на поверхности твердого тела, в полимерных матрицах и в растворах; использовании выявленных закономерностей и экспериментальных параметров для анализа структуры и оптических свойств биомолекул при патологиях, а также создания новых методик.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить безызлучательные процессы переноса электронной энергии в области металл-усиленной флуоресценции между адсорбатами молекул родамина 6Ж и НЧ серебра на шероховатом стекле, в том числе на подвергнутом процессу низкотемпературного термического воздействия (до 350°C), а также в пленке ПВС.

2. Провести теоретическую оценку степени усиления комбинационного рассеяния света и параметров металл-усиленной флуоресценции и поглощения Р6Ж и НЧ серебра, а также параметров переноса энергии в модельных средах: пленках ПВС и на поверхностях шероховатого стекла.

3. Методами колебательной и флуоресцентной спектроскопии, исследовать конформационное состояние вторичной структуры белковых молекул по группам Амид I, II, III сывороточного альбумина человека (САЧ) в норме и при патологии (сепсис), в растворе и адсорбированных на структурированной серебряной поверхности, в том числе с применением математических методов разрешения спектрального сигнала.

4. Выполнить расчеты коэффициентов усиления комбинационного рассеяния света для молекул белка, адсорбированного на наноструктурированных серебряных пленках.

5. Выполнить расчет параметров анизотропии флуоресценции молекул белка в норме и патологии, а также оценить с их помощью степень конформационных изменений молекул белка при наступлении патологии (сепсис).

6. Разработать экспериментально-теоретический подход к исследованию концентраций молекул АТФ методом конфокальной микроскопии в эритроцитах и митохондриях.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Механизм усиления КР света, позволяющий достичь коэффициента усиления КР  $10^4$  степени в области металл-усиленной флуоресценции и поглощения, с участием молекул Р6Ж и НЧ серебра в пленке ПВС на шероховатом стекле, подвергнутом процессу низкотемпературного (до 350°C) термического спекания.

2. Положение спектрального максимума группы Амид I, характеризующее переход САЧ к неупорядоченной укладке вторичной структуры, определяемые с помощью математических методов обработки спектрального сигнала.

3. Конформационные изменения белковых молекул САЧ, возникающие вследствие наличия патологии «сепсис», определяемые с помощью колебательной и флуоресцентной спектроскопии в растворе и на структурированной серебряной шероховатой поверхности.

4. Флуоресцентный метод для количественного определения концентрации молекул аденозинтрифосфата в клетках крови и митохондриях с точностью до 0,01 мг/мл.

#### **Научная новизна:**

1. Получены новые результаты экспериментальных исследований по биосовместимым модельным матрицам шероховатого стекла и ПВС с внедренными в них НЧ серебра и без НЧ. Показано, что оптическая спектроскопия адсорбатов молекул красителей и НЧ серебра в

пленках ПВС и на поверхности шероховатых стекол, в том числе подвергнутых низкотемпературному термическому отжигу, позволяет получить и оценить эффективность обмена энергией по модели Фёрстера, между электронно-возбужденными и невозбужденными молекулами в среде.

2. Показано, что при наличии НЧ серебра и молекул красителей в матрице ПВС возникают центры поглощения и рассеяния электронной и колебательной энергии. При этом наблюдается усиление флуоресценции и поглощения молекул. Экспериментально установлено, что модифицированные НЧ серебра шероховатые стекла позволяют усилить поверхностными плазмонами НЧ серебра сигнал КРС на молекулах Р6Ж (до  $10^4$ ).

3. Впервые экспериментально, с применением методов флуоресцентной и колебательной спектроскопии, исследована вторичная структура белковых молекул при патологии (сепсис), в растворе и адсорбированных на структурированной серебряной поверхности, в том числе путем определения параметров энергетического обмена белковой молекулы в присутствии НЧ серебра. Показано, что количество  $\alpha$ -трубчатых слоев в молекуле белка уменьшается и молекула претерпевает конформационные изменения ее вторичной структуры. Показано увеличение флуоресценции аминокислотных остатков триптофана (Trp) вследствие выхода остатков Trp на поверхность белковой глобулы.

4. Предложена последовательность применения алгоритмов математической обработки для разрешения ИК-спектров и выделения сдвигов в характеристических полосах амидных групп.

5. Впервые предложен неинвазивный адресный флуоресцентный метод оценки *in vitro* концентрации короткоживущих молекул АТФ в клетках крови и митохондриях пациентов для прогнозирования степени тяжести побочных реакций при проведении химиотерапии острых лимфобластных лейкозов.

#### **Научная и практическая значимость работы:**

1. Эффект контролируемого плазмонного усиления КР, регистрируемый на синтезированных наноструктурированных поверхностях шероховатого серебра может быть использован в колебательной спектроскопии белков для анализа их конформационных особенностей.

2. Предложенная последовательность применения алгоритмов математической обработки ИК-спектров может быть использована для разрешения сигналов в спектральном анализе белковых молекул, клеток.

3. Полученные закономерности в результате применения металл-усиленной флуоресценции и анизотропии в комплексе НЧ-белок в растворе могут быть использованы для анализа вторичной структуры белковых молекул путем оценки параметров энергетического обмена в комплексе НЧ-белок и коэффициента вращательной диффузии белковой молекулы.

4. Предложенный адресный неинвазивный флуоресцентный метод оценки концентрации короткоживущих молекул АТФ в клетках крови и митохондриях пациентов *in vitro* может быть использован в медицине для оценки состояния пациентов, получающих химиотерапию, при лечении острого лимфобластного лейкоза.

**Степень достоверности результатов** проведенных исследований обеспечивается тщательной и глубокой проработкой литературных данных по теме диссертации с последующей постановкой актуальных экспериментов, а также применением современного инструментария для достижения целей и задач диссертации, публикацией основных положений диссертации в рецензируемых журналах, в том числе международных изданиях. Для математической обработки результатов исследований использованы современные компьютерные программы Origin Pro, MathCad и MagicPlot Pro.

**Личный вклад автора.** Автором лично были выполнены все, обозначенные в диссертации эксперименты, за исключением экспериментов по исследованию поглощения/флуоресценции пленок ПВХ с участием НЧ и красителей. Автором лично произведена интерпретация данных колебательной и флуоресцентной спектроскопии, проведен анализ конформационного состояния вторичной структуры белковых молекул в норме и при патологии. Автором лично были произведены теоретические расчеты коэффициентов усиления КР, параметров анизотропии флуоресценции, параметров диполь-дипольного переноса плазмонной энергии в комплексе НЧ-белок, РБЖ-НЧ в матрице ПВХ и на поверхности шероховатых стекол. Автором предложена последовательность математической обработки спектральных данных для идентификации изменений в группах Амид I, II, III и идентификации выхода аминокислотных остатков Trp на поверхность белковой глобулы. Автором лично была разработана экспериментальная методика регистрации флуоресценции молекул АТФ. При участии автора были осуществлены эксперименты флуоресцентной спектроскопии по определению квантового выхода флуоресценции САЧ, произведены модельные исследования биосовместимых модельных матриц шероховатого стекла и ПВХ, синтезированы шероховатые тонкие пленки серебра.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертации были изложены в 27 работах, включающих в себя 8 статей в рецензируемых научных изданиях по Перечню ВАК или приравненных к ним и двух патентах на изобретение. Результаты доложены и обсуждены: на XIX International Conference on European Science and Technology (Мюнхен, 2015), на международной конференции «Оптика и спектроскопия конденсированных сред» (Краснодар, 2015, 2016), на международном молодежном научном форуме «Ломоносов – 2016» (Москва, 2016), на IV международном Балтийском форуме (Калининград, 2016), на международной конференции SPIE “Photonics Asia 2016” (Пекин, 2016), на международной конференции по фотонике и информационной оптике (Москва, 2016, 2017), на международном симпозиуме по биофотонике «Saratov Fall Meeting» (Саратов 2016, 2017), на международной молодежной

научной школе-конференции, посвященной 75-летию НИЯУ МИФИ и 95-летию академика Н.Г. Басова, на международном симпозиуме по электромагнетизму «PIERS» (Санкт-Петербург, Сингапур, 2017), на международной конференции по биофотонике «Biophotonics-Riga» (Рига, 2017), на XXX Школе-симпозиуме по голографии, когерентной оптике и фотонике (Калининград, 2017).

Автор занял второе призовое место на III Всероссийском конкурсе научно-исследовательских работ молодых ученых «Наука будущего наука молодых» в секции «Физика и астрономия» (Нижний Новгород, 2017), а также стал лауреатом конкурса «Научная молодость» БФУ им. И. Канта (Калининград, 2017).

**Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК и индексируемых международными базами цитирования Scopus/Web of Science:**

1. Тихомирова Н. С. Самусев И.Г., Слежкин В.А., **Зюбин А.Ю.**, Брюханов В.В. ПЛАЗМОННЫЕ ПРОЦЕССЫ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОННОЙ ЭНЕРГИИ НА МОЛЕКУЛЫ АД-СОРБАТА РОДАМИНА 6Ж ПРИ КЛАСТЕРИЗАЦИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ПОВЕРХНОСТИ МАКРОПОРИСТОГО КРЕМНЕЗЕМА //Журнал прикладной спектроскопии. – 2017. – Т. 84. – №. 2. – С. 240-247. (личный вклад – 30%)

2. Lavrova A.I., Postnikov E.B., **Zyubin A.Yu.**, Babak S.V. Ordinary differential equations and Boolean networks in application to modelling of 6-mercaptopurine metabolism //Royal Society open science. – 2017. – Т. 4. – №. 4. – С. 160872. (личный вклад – 50%)

3. **Zyubin A. Y.** et al. Application of silver films with different roughness parameter for septic human serum albumin detection by Surface Enhanced Raman Spectroscopy //Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2018. – Т. 945. – №. 1. – С. 012011. (личный вклад – 80%)

4. Konstantinova, E. I., **A. U. Zyubin**, V. A. Slezhkin, I. G. Samusev, and V. V. Bryukhanov. Plasmon enhancement of Raman scattering and fluorescence for rhodamine 6G molecules in the porous glass and PVA films with nanoparticles of silver citrate hydrosol //Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2016. – Т. 737. – №. 1. – С. 012037. (личный вклад – 40%)

5. Malashchenko V., **Zyubin A.**, Babak S., Lavrova A. ATP concentration as possible marker of liver damage at leukaemia treatment: confocal microscopy-based experimental study and numerical simulations //Saratov Fall Meeting 2016: Laser Physics and Photonics XVII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data III. – International Society for Optics and Photonics, 2017. – Т. 10337. – С. 103371B. (личный вклад – 70%)

6. Samusev I.G., Tikhomirova N.S., Slezhkin V.A., **Zyubin A.Yu.**, Bryukhanov V.V., Tsibulnikova A.V. Silver nanoparticles plasmonic effect on eosin and rhodamine 6G luminescence in various media //Nanophotonics and Micro/Nano Optics III. – International Society for Optics and Photonics, 2016. – Т. 10027. – С. 1002714. (личный вклад – 30%)

7. **Zyubin A.**, Lavrova A., Babak S., Malashchenko V., Borisova A., Opryshko N. Zyubin A. et al. Childhood lymphoblastic leukemia adverse drug reactions: study of risk factors and therapy prognosis by optical methods //Optics in Health Care and Biomedical Optics VII. – International Society for Optics and Photonics, 2016. – Т. 10024. – С. 1002432. (личный вклад – 80%)

8. **Zyubin, A.**, E. Konstantinova, V. Slezhkin, K. Matveeva, I. Samusev, and V. Bryukhanov. Application of fluorescent and vibration spectroscopy for septic serum human albumin structure deformation during pathology //Biophotonics—Riga 2017. – International Society for Optics and Photonics, 2017. – Т. 10592. – С. 1059205. (личный вклад – 80%)

#### **Патенты:**

1. Патент на изобретение РФ № RU 2642589/C2, 25.01.2018. Зюбин А.Ю., Бабак С.В., Лаврова А.И., Демин М.В. Флуоресцентный способ прогнозирования эффективности химиотерапии у детей, больных острым лимфобластным лейкозом, путем определения концентраций аденозинтрифосфата в митохондриях // *Патент России* № 2642589. 2018. Бюл. № 3. 2018.

2. Патент на изобретение РФ № RU 264783/C2, 19.03.2018. Зюбин А.Ю., Бабак С.В., Лаврова А.И., Демин М.В. Флуоресцентный способ прогнозирования эффективности химиотерапии у детей, больных острым лимфобластным лейкозом // *Патент России* № 2642589. 2018. Бюл. № 8. 2018.

#### **СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

Во **введении** обоснована актуальность исследований, отраженных в диссертационной работе, сформулированы ее цели, задачи. Определены объект и предмет исследования, методы исследований, научная новизна и практическая ценность полученных результатов. Приводятся положения, выносимые на защиту, отражена степень достоверности результатов. В данном разделе приведена информация о личном вкладе автора и ее апробировании.

В **первой** главе диссертации приведены сведения о методах флуоресцентной и колебательной спектроскопии и их применении для анализа структуры и свойств биомолекул. В разделе дано теоретическое описание плазмонных эффектов в оптической спектроскопии и их обозначены аспекты их практического использования. Приведен обзор химических и физических методов синтеза плазмонных материалов контролируемых размеров и их применение в исследовании биомолекул, в том числе при патологии.

**Вторая** глава отражает описание экспериментальных установок и методов флуоресцентной, колебательной спектроскопии, а также атомно-силовой и оптической микроскопии, с помощью которых были проведены исследования, отраженные в диссертационной работе. В разделе описаны физические и химические методы синтеза сферических наночастиц размером до 100 нм, а также методы прободготовки, шероховатых стекол, в том числе модифицированных НЧ серебра и модельных пленок поливинилового спирта (ПВС) с внедренным красителем родамин 6Ж (Р6Ж) и наночастицами (НЧ) серебра. В разделе подробно



описывается создание наноструктурированных серебряных пленок выполнения экспериментов усиленного комбинационного рассеяния биомолекул сывороточного альбумина человека (САЧ), Детально описана пробоподготовка биомолекул белка сывороточного альбумина человека (САЧ), аденозинтрифосфата (АТФ).

В **третьей** главе приведены результаты модельных исследований фотофизических процессов поглощения, флуоресценции и комбинационного рассеяния, в области металл-усиленной флуоресценции, биосовместимых модельных матриц шероховатого стекла и пленок ПВС, с внедренными в них НЧ серебра и без НЧ. Основной целью главы был подбор оптимальных экспериментальных условий для анализа молекул САЧ, в том числе при патологии. В разделе также было показано, что оптическая спектроскопия адсорбатов молекул красителей и НЧ серебра в пленках ПВС и на поверхности шероховатых стекол позволяет получить и оценить эффективность обмена энергией между электронно-возбужденными и невозбужденными молекулами в среде.

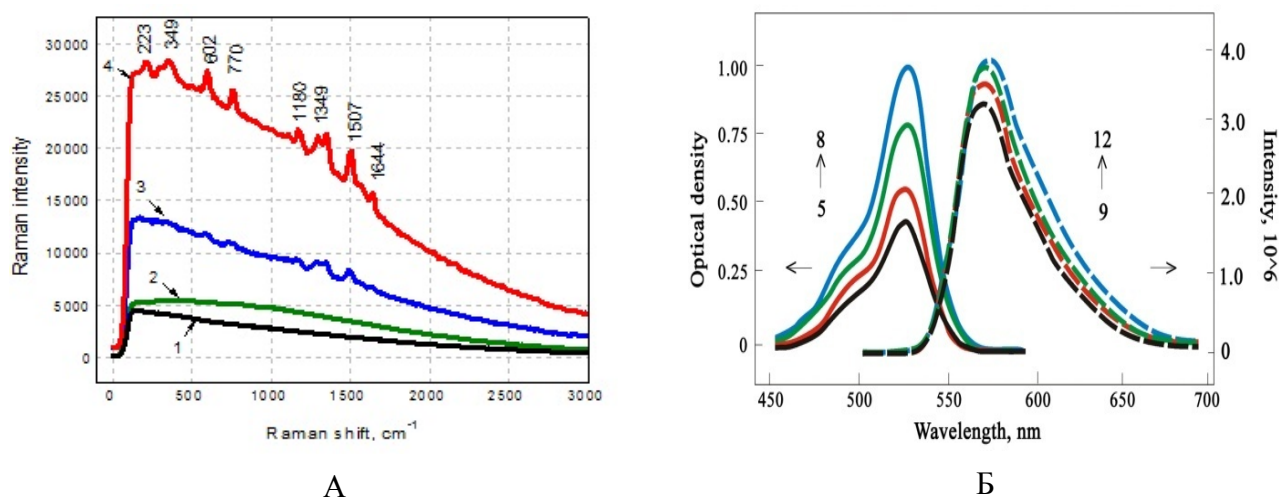


Рисунок 1 - А) Спектры КР (кривые 1 – 4). Б) Спектры поглощения (кривые 5 – 8) и флуоресценции (кривые 9 – 12) Р6Ж в пленке ПВС на шероховатом стекле, модифицированном НЧ серебра. Концентрация НЧ серебра на поверхности шероховатого стекла (М): кривые 1, 5, 9 – 0; кривые 2, 6, 10 –  $1 \cdot 10^{-11}$  М; кривые 3, 7, 11 –  $2,5 \cdot 10^{-10}$  М; кривые 4, 8, 12 –  $4,5 \cdot 10^{-10}$  М. Для кривых 3 и 4 интенсивность рассеяния имеет множитель  $10^2$  (использован фильтр, ослабляющий излучение в 100 раз)

Установлено, что при наличии НЧ серебра и молекул красителей в ПВС возникают центры поглощения и рассеяния электронной и колебательной энергии, проявляющееся в спектрах КРС и ГКРС молекулами родамина 6Ж, причем наблюдается усиление безызлучательного *dd*- переноса плазмонного возбуждения с НЧ серебра, а также усиление флуоресценции молекул. Данные результаты в полной мере согласуются с работой [13]. Вместе с тем, модифицирование поверхности шероховатого стекла золем НЧ серебра приводит к появлению новых свойств, позволяющих использовать их в качестве оптического сенсора как

усилителя молекулярной флуоресценции (Рис. 1). Для оценки коэффициента усиления гигантского комбинационного рассеяния была использована формула:

$$SE = \frac{I_{SERS}}{I_{RS}} \cdot \frac{C_{RS}}{C_{SERS}}, \quad (1)$$

где  $I_{SERS}$ ,  $I_{RS}$  – интенсивность ГКР и КР на выбранной частоте соответственно,  $C_{SERS}$  и  $C_{RS}$  – концентрация веществ в эксперименте с ГКР и КР соответственно.

По результатам рассчитанных коэффициентов усиления ГКРС, показано существенное усиление рассеяния света молекулами Р6Ж в присутствии НЧ на шероховатых стеклах (до  $2,5 \cdot 10^4$  раз) по сравнению с Р6Ж в присутствии НЧ без шероховатого стекла. Это может быть вызвано наличием на шероховатой поверхности рассеивающих центров, которые участвуют как в процессе рассеяния молекулами Р6Ж, так и в процессе их флуоресценции. Пространственное ограничение, существующее ввиду наличия на поверхности пор, приводит к образованию молекулярного комплекса.

Детектирование интенсивности флуоресценции молекул Р6Ж в пленке ПВС показало, что сдвиг частот максимума испускания флуоресценции в красную область, обусловленного генерацией поверхностных плазмонов в НЧ серебра происходит незначительно, однако при этом достаточно уверенно детектируется синий сдвиг частот стоксовых колебаний КРС НЧ серебра. Можно предположить, что интенсивность спектров КРС Р6Ж в пленке ПВС вблизи поверхности обусловлено установлением взаимодействия между цепями полимеров и красителем на уровне частот колебаний групп СО- и ОН-.

В результате исследований было установлено, что модифицированные шероховатые стекла позволяют усилить поверхностными плазмонами НЧ серебра КРС на молекулах Р6Ж (до порядков  $10^4$ ). Перенос энергии в системе НЧ-краситель может быть описан в рамках модели Фёрстера. Эффективность переноса оценивалась по формуле:

$$E = 1 - \frac{I_{fl}}{I_{f0}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (2)$$

Эффективный радиус переноса был рассчитан в соответствии:

$$R_0 = 0,2108 \left\{ \frac{k^2 \varphi}{n^4} \int_0^\infty I_D(\lambda) \xi_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \right\}^{\frac{1}{6}} \quad (3)$$

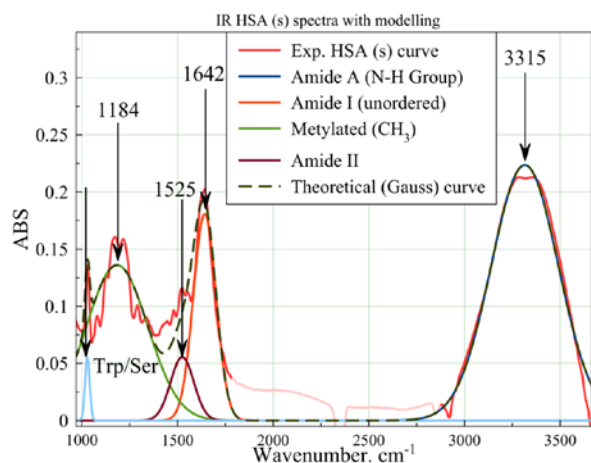
Было установлено, что константа скорости  $dd$ - переноса достигает порядка  $k_{dd} = 5,7 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$ , а эффективный радиус переноса и расстояние между молекулой красителя и НЧ составляет  $R_0 = 5,41 \text{ нм}$  и  $r = 6,52 \text{ нм}$  соответственно. Однако детектируемые КР спектральные пики спектров Р6Ж (табл. 1) имеют выраженные сдвиги в синюю и красную область относительно литературных данных [14] и библиотеки KnowItAll Academic Edition (BioRad), что не позволяет обеспечить необходимую степень повторяемости для анализа сложных биомолекул - белков, исследуемых в данной работе.

Экспериментальные и теоретические данные детекции максимумов Р6Ж

№ п/п	Состав структуры	$\nu_{h, \text{exp}}, \text{cm}^{-1}$	$\nu_{h, \text{теор (лит)}}, \text{cm}^{-1}$
1	<b>Р6Ж+ПВС</b> на стекле+ НЧ Ag	222, <b>349, 602, 770,</b> <b>1180, 1349,</b> 1370, <b>1507, 1644</b>	300, <b>375, 518, 604,</b> <b>1172, 1356, 1504,</b> 1571, <b>1647</b>
2	<b>Р6Ж+ПВС+Ag</b>	<b>380, 612, 770, 1191,</b> <b>1370, 1518, 1664</b>	300, <b>375, 518, 604,</b> 1172, <b>1356, 1504,</b> 1571, <b>1647</b>

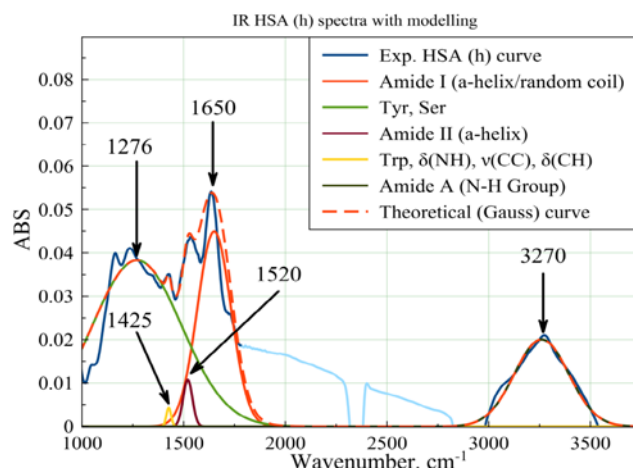
В связи с этим, при изложении последующих экспериментальных результатов исследований молекул САЧ были использованы проясненные в данной главе механизмы и закономерности энергетического поведения для металл-усиленной флуоресценции, но рассмотрены иные матрицы для достижения усиления спектрального сигнала, созданные на основе наноструктурированного серебра на подложке.

В **четвертой** главе отражены результаты спектроскопических исследований структуры молекулы САЧ и поведения остатка Trp в норме и при сепсисе. В результате применения методов колебательной спектроскопии (ИК-Фурье, КР, усиленное КР) были расшифрованы основные полосы частот спектра белковой молекулы в области 800-1700  $\text{cm}^{-1}$ , характеризующие ее вторичную структуру и ее изменения: Амид I, Амид II, Амид III, скелетные колебания молекулы. Показано, что в случае исследований белка при сепсисе деформацию претерпевают группа Амид I,III. С помощью ИК-Фурье спектроскопии (Рис. 2а, Рис. 2б) были зарегистрированы и идентифицированы основные группы колебаний САЧ, которые включали в себя характерные полосы колебаний Амид А - N-H (3317  $\text{cm}^{-1}$ ), колебаний связи C=O (1640-1660  $\text{cm}^{-1}$ , полоса Амид I) и деформацией связи N-H (1520-1550  $\text{cm}^{-1}$ , полоса Амид II) и различных аминокислотных остатков, которые могут быть отнесены к Trp/Ser [15]. Установлено различие в интенсивности поглощения белковых молекул в норме и при сепсисе. В случае септического САЧ поглощение увеличивается от 1,8 до 11 раз в зависимости от амидной группы.



А

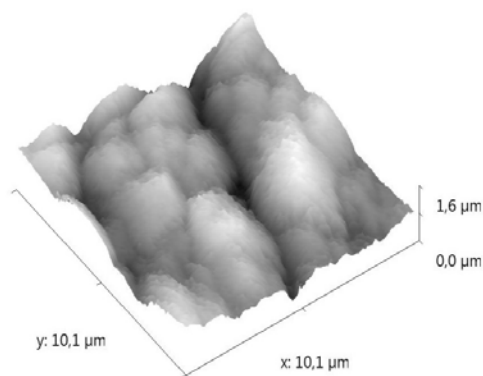
Рис. 2А. - ИК-Фурье-спектры поглощения САЧ септических пациентов с отображением пиков групп Амид I, II ( $1642\text{ см}^{-1}$ ,  $1525\text{ см}^{-1}$  соответственно) и пика Trp/Ser ( $1029\text{ см}^{-1}$ ) с разрешением спектрального сигнала по методу Савицкого-Голя и последующего моделирования с использованием функции Гаусса для септического САЧ



Б

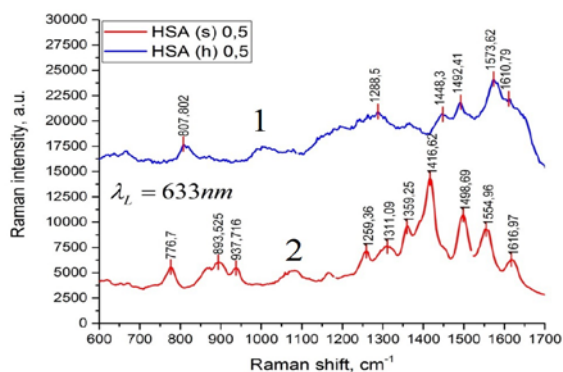
Рис. 2Б. ИК-Фурье-спектры поглощения САЧ септических пациентов с отображением пиков групп Амид I, II ( $1650\text{ см}^{-1}$ ,  $1520\text{ см}^{-1}$  соответственно) с разрешением спектрального сигнала по методу Савицкого-Голя и последующего моделирования с использованием функции Гаусса для здорового САЧ

По данным спектроскопии поверхностно-усиленного КР который был реализован с применением синтезированных наноструктурированных шероховатых серебряных поверхностей (Рис. 3а), были идентифицированы и расшифрованы основные полосы частот спектра белковой молекулы, характеризующие ее вторичную структуру: Амид I, Амид III и скелетных колебаний молекулы. Показано, что в случае исследований белка при сепсисе деформацию претерпевают группы Амид I, Амид III, их связи C=O и водородные O–H связи соответственно, которые становятся более хаотичными. Также показано, что аминокислотный остаток тирозина (Тур) может быть детектирован ( $1610$ ,  $1616\text{ см}^{-1}$ ) и упаковывается внутрь молекулярной структуры (характерный пик  $807\text{ см}^{-1}$  не детектируется в случае септического САЧ) (Рис 3б).



А

Рис. 3А - АСМ-изображение поверхности электрохимически синтезированных шероховатых пленок серебра для получения поверхностно-усиленного сигнала КР: подложка усиления сигнала КР с анодным растворением слоя серебра глубиной 0,5 мкм



Б

Рис. 3Б Спектры поверхностно-усиленного КР САЧ здоровых пациентов (синяя линия) и пациентов, зараженных сепсисом (красная линия), зарегистрированные при использовании подложек с АР 0,5 мкм. Возбуждение на длине волны, время регистрации спектра – 100 с

Для сигнала поверхностно-усиленного КРС для САЧ, эффективное усиление сигнала составило значение порядка 40 раз для САЧ при сепсисе на подложке со снятием слоя 0,5 мкм. С помощью метода флуоресцентной спектроскопии были исследованы особенности флуоресценции аминокислотного остатка триптофана-214. Показано увеличение

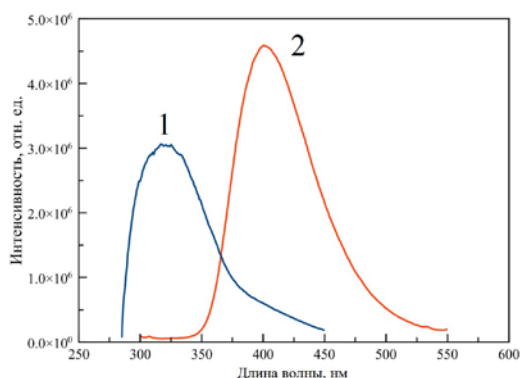


Рис. 4 - Спектры флуоресценции аминокислотного остатка Trp 214 САЧ в норме (Кривая 1) и при сепсисе (кривая 2). Длина волны возбуждения  $\lambda = 280 \text{ нм}$

флуоресценции аминокислотных остатков вследствие их комплексообразования и выходов остатков триптофана на поверхность, что подтверждается данными ИК-спектроскопии. По результатам исследования белковых молекул с помощью металл-усиленной флуоресценции была установлена возможность переноса плазмонной энергии в комплексе НЧ-молекула белка по механизму Фёрстера, рассчитаны параметры переноса. Показаны различия параметров переноса для здоровых и септических молекул САЧ, Также показаны различия анизотропных свойств молекулы белка в норме и при септической патологии. Было установлено, в соответствии с формулами (1-3), что константа скорости  $dd$ - переноса достигает порядка для здорового и септического белков составляет  $k_{dd}$

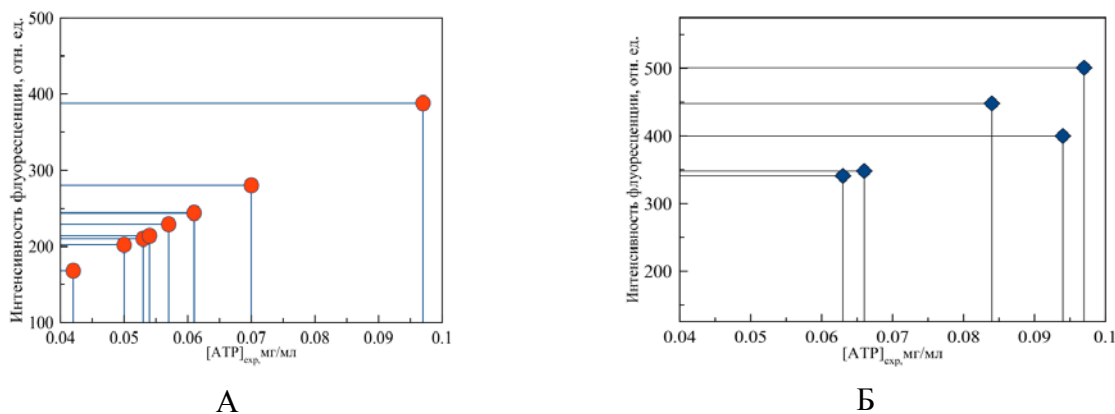
$= 8,4 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$  и  $73 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$  соответственно, эффективный радиус переноса и расстояние между молекулой красителя и НЧ составляет  $R_0 = 2,4 \text{ нм}$  и  $R_0 = 2,4 \text{ нм}$  соответственно, радиус между молекулой НЧ и молекулой белка составляет:  $r = 4,0 \text{ нм}$  и  $r = 3,6 \text{ нм}$  соответственно. В рамках данной теории, коэффициент вращательной  $D_{\text{вр}}$  диффузии может быть определен согласно выражению

$$\frac{r}{r_0} = 1 + 6D_{\text{вр}}\tau, \quad (4)$$

где  $r_0$  – анизотропия для неподвижного флуорофора (зонда),  $\tau$  – время жизни возбужденного состояния молекулы САЧ.

При известном времени жизни триптофаного остатка САЧ  $\tau = 5,8 \text{ нс}$  значение  $D_{\text{вр}}$  составило  $5 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$  и  $2,9 \cdot 10^7 \text{ c}^{-1}$  для САЧ с сепсисом и здорового САЧ соответственно. Установлен факт значительного уменьшения коэффициента вращательной диффузии (на 82%) для молекул САЧ с сепсисом и увеличение степени поляризации флуоресценции что указывает на разворачивание молекул САЧ при сепсисе, которое может происходить в результате ее частичной денатурации вследствие патологии.

**Пятая** глава отражает результаты проведенных исследований, в результате которых была разработана флуоресцентная методика анализа концентрации аденозинтрифосфата (АТФ) в клетках крови и митохондриях в различном состоянии клеточной гибели. Показано, что концентрации могут выступать АТФ может быть прогностическим маркером оценки состояния клетки в текущий момент времени. Рисунок отражает значение концентраций АТФ для клеток, находящихся в состоянии позднего апоптоза – некроза (рис. 5).



*Рис. 5 - Экспериментально определенные концентрации АТФ для клеток крови (А) и их митохондрий (Б). Детектирование проводилась в спектре свечения люцеферина желтого (в видимом диапазоне 500 – 700 нм) с максимумом на длине волны 536 нм*

Установлено, что количественное содержание молекул АТФ в клетках крови и митохондриях может быть оценено с помощью флуоресцентных методов исследования.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Экспериментально исследованы биосовместимые модельные матрицы шероховатого стекла и ПВС, с внедренными в них НЧ серебра и без НЧ. Показано, что оптическая спектроскопия адсорбатов молекул красителей и НЧ серебра в пленках ПВС и на поверхности шероховатых стекол позволяет получить и оценить эффективность обмена энергией, с использованием модели Фёрстера, между электронно-возбужденными и невозбужденными молекулами в среде. Установлено, что при наличии НЧ серебра и молекул красителей в матрице ПВС возникают центры поглощения и рассеяния электронной и колебательной энергии, проявляющееся в спектрах КР и ГКР молекул Р6Ж. При этом наблюдается усиление безызлучательного *dd*-переноса плазмонного возбуждения в НЧ серебра, а также усиление флуоресценции молекул.

2. Экспериментально установлено, что модифицированные НЧ серебра шероховатые стекла позволяют усилить ПП НЧ серебра КРС на молекулах Р6Ж (до  $10^4$ ), однако матрицы шероховатых стекол имеют детектируемые спектральные сдвиги в спектрах Р6Ж относительно литературных данных и не обеспечивают необходимую степень повторяемости для анализа белковых молекул.

3. Экспериментально исследована вторичная структура белковых молекул в норме и при патологии, адсорбированных на структурированной серебрянной поверхности и в растворе, в том числе путем определения параметров энергетического обмена белковой молекулы и НЧ серебра. Обнаружено изменение вторичной структуры белковой молекулы, вследствие наличия патологии (сепсис). По результатам анализа групп Амид I, Амид III показано, что количество  $\alpha$ -трубчатых слоев в молекуле белка уменьшается, молекула переходит к неупорядоченной укладке вторичной структуры.

4. Предложена последовательность применения математических средств разрешения ИК-спектров и выделения различий сдвигов амидных групп: алгоритмы полиномиального сглаживания Савицкого-Голея по 32 окнам и, последующее моделирование аппроксимированных спектров с использованием функции Гаусса.

5. Обнаружено усиление флуоресценции аминокислотных остатков триптофана вследствие выхода остатков триптофана на поверхность белковой глобулы при патологии. По итогам применения модели металл-усиленной флуоресценции в комплексе НЧ-белок в растворе установлена возможность переноса плазмонной энергии с молекулы белка на НЧ по механизму Ферстера, рассчитаны параметры переноса, а также показаны различия параметров переноса и параметров анизотропии флуоресценции для здоровых и септических молекул САЧ.

6. Предложен неинвазивный флуоресцентный метод оценки концентрации короткоживущих молекул АТФ в клетках крови и митохондриях пациентов *in vitro* для прогнозирования степени тяжести побочных реакций при терапии. Определены концентрации моле-

кул АТФ в клетках крови и митохондриях для тяжелой степени нежелательных побочных реакций при терапии.

#### СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gonçalves M. S. T. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes //Chemical reviews. – 2008. – Т. 109. – №. 1. – С. 190-212.
2. Moerner W. E., Orrit M. Illuminating single molecules in condensed matter //Science. – 1999. – Т. 283. – №. 5408. – С. 1670-1676.
3. Weiss S. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules //Science. – 1999. – Т. 283. – №. 5408. – С. 1676-1683.
4. Haes A. J. et al. Solution-phase, triangular Ag nanotriangles fabricated by nanosphere lithography //The Journal of Physical Chemistry B. – 2005. – Т. 109. – №. 22. – С. 11158-11162.
5. Hao E., Schatz G. C. Electromagnetic fields around silver nanoparticles and dimers //The Journal of chemical physics. – 2004. – Т. 120. – №. 1. – С. 357-366.
6. Zhao L. et al. Electrodynamics in computational chemistry //Theory and applications of computational chemistry: the. – 2007. – С. 47-66.
7. Bertone J. F., Spencer K. M., Sylvia J. M. Fingerprinting CBRNE materials using surface-enhanced Raman scattering //Chemical, Biological, Radiological, Nuclear, and Explosives (CBRNE) Sensing IX. – International Society for Optics and Photonics, 2008. – Т. 6954. – С. 69540J.
8. 133. Graham D. et al. The crystal structures of three primary products from the selective reduction of 2, 4, 6-trinitrotoluene //New Journal of Chemistry. – 2004. – Т. 28. – №. 1. – С. 161-165.
9. Sueyoshi K. et al. Fluorescence imaging of ATP in neutrophils from patients with sepsis using organelle-localizable fluorescent chemosensors //Annals of intensive care. – 2016. – Т. 6. – №. 1. – С. 1-8.
10. 183. Tan K. Y. et al. Real-Time Monitoring ATP in Mitochondrion of Living Cells: A Specific Fluorescent Probe for ATP by Dual Recognition Sites //Analytical Chemistry. – 2017. – Т. 89. – №. 3. – С. 1749-1756.
11. Barhoumi A., Halas N. J. Detecting chemically modified DNA bases using surface-enhanced Raman spectroscopy //The journal of physical chemistry letters. – 2011. – Т. 2. – №. 24. – С. 3118-3123.
12. Mark S. et al. Fourier transform infrared microspectroscopy as a quantitative diagnostic tool for assignment of premalignancy grading in cervical neoplasia //Journal of biomedical optics. – 2004. – Т. 9. – №. 3. – С. 558-567.
13. Зейниденов А. К., Ибраев Н. Х., Кучеренко М. Г. Влияние наночастиц серебра на электронные переходы в молекулах красителей и генерационные характеристики жидкостных лазеров на их основе //Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – №. 9 (170).
- 14 Shim S., Stuart C. M., Mathies R. A. Resonance Raman Cross-Sections and Vibronic Analysis of Rhodamine 6G from Broadband Stimulated Raman Spectroscopy //ChemPhysChem. – 2008. – Т. 9. – №. 5. – С. 697-699.
15. Barth A. The infrared absorption of amino acid side chains //Progress in biophysics and molecular biology. – 2000. – Т. 74. – №. 3. – С. 141-173



**Зюбин Андрей Юрьевич**

**СПЕКТРАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ С УЧАСТИЕМ МОЛЕКУЛ КРАСИТЕЛЕЙ И БИОМОЛЕКУЛ В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Подписано в печать \_\_.\_\_.2018 г.

Формат 60×90<sup>1/16</sup>.

Усл. печ. л. 1,0

Тираж 120 экз. Заказ \_\_

Отпечатано в типографии  
Издательства Балтийского федерального университета  
им. Иммануила Канта  
236022, г. Калининград, ул. Гайдара, 6