

На правах рукописи



СЕМЕНОВА АННА АЛЕКСАНДРОВНА

**НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ СЕРЕБРА
ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ МЕТОДОМ
ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ**

Специальность

02.00.21 – химия твердого тела

02.00.01 – неорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2012

Работа выполнена на кафедре наноматериалов факультета наук о материалах Федерального государственного бюджетного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор,
член-корреспондент РАН
Гудилин Евгений Алексеевич

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Максимов Георгий Владимирович

Официальные оппоненты: **Губин Сергей Павлович**
доктор химических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт общей и неорганической химии
им. Н.С.Курнакова РАН, заведующий лабораторией
химии наноматериалов

Коршун Владимир Аркадьевич
доктор химических наук, старший научный сотрудник,
Учреждение Российской академии наук Институт
биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова РАН, руководитель группы
биокоњугации

Ведущая организация: Институт металлургии и материаловедения
им. А. А. Байкова РАН

Защита состоится «23» ноября 2012 года в 16:00 на заседании Диссертационного Совета Д.501.002.05 по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 73 (лабораторный корпус Б), факультет наук о материалах, ауд. 235.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «23» октября 2012 года

Ученый секретарь
Диссертационного Совета Д.501.002.05,
кандидат химических наук  Еремина Елена Алимовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Одним из перспективных направлений современных исследований является разработка способов синтеза наночастиц для важнейших биомедицинских приложений, таких как диагностика, визуализация, терапия и доставка лекарств. В последнее время значительно вырос интерес к спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) как универсальному методу для анализа биологических молекул [1-3]. К основным преимуществам метода относят высокую чувствительность, качественное определение молекул по характеристическим спектрам, простоту пробоподготовки, уникальную возможность усиления сигнала комбинационного рассеяния (КР) до 10^{14} раз [2]. Одной из последних тенденций приложений ГКР-спектроскопии является анализ живых клеток. В случае исследования живых клеток возникает ряд существенных и пока еще не решенных проблем, связанных с поиском эффективных, неинвазивных и воспроизводимых методов исследования, обладающих высокой селективностью и информативностью. В основе метода ГКР лежит эффект плазмонного резонанса, которым обладают наночастицы (НЧ) металлов (например, Ag, Au, Pt) и наноструктурированные материалы на основе ряда металлов, поэтому ключевыми в данной, практически важной, проблеме являются материаловедческие аспекты. В связи с этим, **актуальным** является создание новых ГКР-активных наноматериалов для исследования биомолекул в составе живых клеток.

Особое место занимают НЧ благородных металлов, которые эффективно рассеивают и поглощают свет и, обладая плазмонным резонансом, позволяют наиболее эффективно усиливать сигнал КР и регистрировать ГКР-спектры. Дополнительным важным фактором, обуславливающим широкое практическое применение НЧ благородных металлов и наноструктур на их основе, является их достаточно высокая химическая инертность, что влечет за собой возможность продолжительного существования НЧ в биологических средах, водных растворах электролитов, а также их хорошую биосовместимость. Самым востребованным металлом для плазмоники и метода ГКР является серебро, имеющее наибольшую интенсивность полосы поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и обладающее высоким коэффициентом экстинкции в максимуме этой полосы [4, 5]. Положение полосы ППР наночастиц серебра (НЧС) можно варьировать в широких пределах от видимой до ближней инфракрасной области путем изменения морфологии и размера частиц, создания их агрегатов и более сложных наноструктур, изменения диэлектрической проницаемости окружающей их среды. Контролируемое изменение параметров позволяет «настраивать» НЧ для конкретных задач практического применения, поэтому, с точки зрения химии, ключевую роль играет разработка новых методов синтеза НЧС и наноструктур на их основе с заданными геометрическими параметрами, агрегатной структурой и, соответственно, требуемыми оптическими свойствами.

Цели и задачи работы

Целью настоящей работы является поиск и разработка новых наноструктурированных материалов на основе металлического серебра с заданными морфологией и оптическими свойствами для исследования эритроцитов методом ГКР-спектроскопии.

Для достижения цели решались следующие задачи:

- установление основных критериев практической применимости наноматериалов на основе серебра для ГКР-спектроскопии биологических объектов в водной среде;
- анализ оптимальных размеров и морфологии ГКР-активных наночастиц путем моделирования их оптических свойств методом дискретно-дипольного приближения (ДДП);
- разработка методик получения НЧС с контролируемым размером (10 – 100 нм), морфологией (сферы, нити, пластинки, частицы сложной формы и наноструктуры), положением полосы плазмонного резонанса (380 – 700 нм) и стабильностью в растворах электролитов, используемых для анализа биологических объектов;
- анализ биосовместимости полученных наноматериалов;
- анализ корреляций состава, структуры и оптических свойств наноматериалов на основе серебра и эффективности их использования для исследования эритроцитов с использованием спектроскопии ГКР;
- создание биосовместимых наноструктурированных покрытий и композитных материалов на основе серебра, позволяющими получить коэффициенты усиления сигнала КР более 10^3 .

Объекты и методы исследования

Для решения поставленных в работе задач в качестве объектов исследования были выбраны НЧС различной морфологии (сферической, нитевидной, кубической, пластинчатой и более сложной), композитные частицы на основе микросфер диоксида кремния и НЧС; наноструктурированные покрытия на основе металлического серебра. В качестве модельных биологических систем для ГКР рассматривался один из самых важных типов клеток человеческого организма – красные кровяные тельца, а также гемоглобин в составе эритроцитов или выделенный из них.

Исследование полученных НЧС, наноструктурированных материалов на основе серебра и их взаимодействия с клетками крови проводили с использованием ряда физико-химических методов: растровой (РЭМ) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (ПЭМВР); оптической микроскопии; УФ-, видимой, ИК-, КР- и ГКР- спектроскопии; рентгенофазового анализа (РФА); локального рентгеноспектрального анализа (ЛРСА); динамического рассеяния света (ДРС); атомно-силовой микроскопии (АСМ); термического анализа (ТА); капиллярной конденсации азота.

Научная новизна работы может быть сформулирована в виде следующих положений, выносимых на защиту:

1. Впервые разработан метод синтеза НЧС и наноструктурированных покрытий на основе серебра путем разложения аммиачного комплекса гидроксида серебра (I) в водном растворе и в виде аэрозоля.
2. Впервые систематически изучено влияние морфологии, размера НЧС (в виде сфер, пластинок, нитей и кубиков), состояния их поверхности на оптические свойства и ГКР-активность при анализе живых эритроцитов.

3. Впервые экспериментально исследовано влияние эффектов старения золей серебра на их ГКР-активность в отношении живых клеток.
4. Изучен процесс формирования наноструктурированных пленок на основе серебра с иерархической структурой и впервые показана их высокая эффективность в ГКР-спектроскопии живых эритроцитов.
5. Предложена модель, объясняющая эффективность трансмембранной диагностики живых эритроцитов с использованием наноструктурированных материалов на основе серебра, и разработаны методики исследования живых клеток методом ГКР-спектроскопии на примере живых эритроцитов.

Практическая значимость работы состоит в том, что в результате исследований:

1. Даны рекомендации по выбору методов и условий получения НЧС различной морфологии для ГКР-спектроскопии. Показано, что частицы, полученные в оптимальных условиях, стабильны в течение, по крайней мере, нескольких месяцев и характеризуются коэффициентами усиления сигнала КР гемоглобина до 10^4 .
2. Предложено использование нитратного буфера для анализа биологических объектов методом ГКР с использованием НЧС анизотропной формы с целью предотвращения спонтанной рекристаллизации НЧ в присутствии хлорид-ионов, присутствующих в стандартных буферных растворах.
3. Предложена новая методика получения НЧС без примесей посторонних ионов и поверхностно-активных веществ путем термического разложения аммиачного комплекса гидроксида серебра (I).
4. Предложен новый масштабируемый метод нанесения островковых пленок наноструктурированного металлического серебра на различные поверхности методом аэрозольного осаждения. Показана принципиальная возможность использования полученных подложек для исследования красных кровяных телец методом ГКР.
5. Обнаружены корреляции между параметрами кривых распределения, спектрами поглощения и коэффициентом усиления сигнала ГКР, что позволяет оптимизировать процесс синтеза НЧС для изучения биомолекул и живых клеток методом ГКР.

Работа выполнена в рамках проектов РФФИ №№ 10-03-00976-а, 11-03-00761-а, 09-03-12221-офи_м, 11-03-09244-моб_з, 12-03-09326-моб_з, а также П649 в рамках ФЦП развития инфраструктуры наноиндустрии, программ Президиума РАН 2010 – 2012 года и Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

Личный вклад автора

В диссертационной работе представлены результаты научных исследований, выполненных лично автором в период 2009 – 2012 гг. на кафедре наноматериалов факультета наук о материалах и в лаборатории неорганического материаловедения кафедры неорганической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Личный вклад автора заключается в разработке основных методик и проведении экспериментальной работы по получению и анализу образцов, обработке и обобщении полученных результатов и литературных данных,

подготовке публикаций. Часть экспериментальной работы проведена в рамках дипломной работы Р.Г. Сеидовой, руководителем которой являлся автор.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на следующих конференциях: II Международная научная конференция «Наноструктурные материалы-2010: Беларусь-Россия-Украина» (НАНО-2010) (Киев, 2010), Четвертая Всероссийская конференция по наноматериалам (Москва, 2011), E-MRS 2011 Spring Meeting & Bilateral Energy Conference (Ницца, 2011), Пятая международная конференция «Современные достижения бионаноскопии» (Москва, 2011), 8th EBSA European Biophysics Congress (Будапешт, 2011), 2-ая Международная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина» (Московская область, 2011), XIX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Волгоград, 2011), Nanotechnology international forum «Rusnanotech 2011» (Москва, 2011), 17th International Biophysics Congress (Пекин, 2011), 17 ежегодное совещание представителей России, Украины и Республики Беларусь по актуальным проблемам создания новых материалов в рамках расширенного заседания Президиума Международной Ассоциации Академий Наук (Киев, 2012), Первый Байкальский материаловедческий форум (Улан-Удэ, 2012), International Conference of Young Researchers on Advanced Materials – ICYRAM 2012 (Сингапур, 2012), Международная молодежная конференция «Тенденции развития планарных нанотехнологий на основе современного полиграфического оборудования» (PrintNanotech 2012) (Москва, 2012), Международная научная конференция «Достижения и перспективы развития биотехнологии» (Саранск, 2012).

Публикации автора

По результатам проведенных исследований опубликовано 19 работ, включая 5 статей в рецензируемых российских и международных журналах и 14 тезисов докладов на всероссийских и международных научных конференциях.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 199 страницах машинописного текста, иллюстрирована 85 рисунками и 9 таблицами. Список цитируемой литературы содержит 221 наименование. Работа состоит из введения, трех глав (литературного обзора, экспериментальной части, результатов и их обсуждения), выводов, списка литературы и приложений.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи, указаны объекты и методы исследования, новизна и практическая значимость работы.

Первая глава посвящена аналитическому обзору литературы по теме диссертации и включает три основных раздела. В первом разделе обсуждаются оптические свойства наноструктур на основе металлического серебра, в основе которых лежит эффект плазмонного резонанса, а также физические принципы явления ГКР. Во втором разделе рассматриваются основные группы методов получения НЧС и наноструктурированных

материалов на их основе. Третий раздел посвящен обзору основных направлений биологических и медицинских приложений ГР-спектроскопии с использованием наноструктур на основе серебра. В заключительной части сформулированы основные проблемы в данной области, остающиеся не решенными на настоящий момент.

Вторая глава содержит описание экспериментальных методик получения использованных в работе НЧС, наноструктурированных покрытий на основе серебра и композитных частиц $\text{SiO}_2 - \text{Ag}$, подготовки биологических образцов, а также инструментальных методов анализа, примененных для исследования образцов.

Сферические НЧС получали по методике, предложенной Леопольдом и Лендлом [6] и основанной на восстановлении AgNO_3 (10^{-2} М) гидрохлоридом гидроксилamina ($1.7 \cdot 10^{-3}$ М) в водной среде. Синтез проводили при различных температурах (25 – 60 °С). Для получения НЧС полиольным методом AgNO_3 восстанавливали этиленгликолем в присутствии поливинилпирролидона (ПВП) при нагревании (160 °С). Поверхностно-декорированные НЧС получали путем выдерживания частиц с полиольной предысторией после центрифугирования в 10% водном растворе аммиака в присутствии ПВП или без ПВП. Анизотропные НЧС в форме нанопластинок получали цитратным методом. На первой стадии проводили восстановление AgNO_3 (0.11 мМ) боргидридом натрия (5 мМ) в присутствии цитрата натрия (2.05 М) с образованием НЧ – затравок. На второй стадии к смеси водных растворов AgNO_3 (5 мМ), цитрата натрия (30 мМ), ПВП (0.7 мМ) добавляли аликвоту затравок определенного объема (160 – 19200 мкл; объемная доля затравочного раствора составляла 1 – 64%, соответственно) и аскорбиновую кислоту (1 мМ). Полученные образцы центрифугировали. Дополнительно НЧС в форме пластинок наносили на целлюлозный носитель путем накапывания и высушивания смеси НЧС на беззольный фильтр. В рамках подхода «зеленой» химии НЧС получали восстановлением AgNO_3 (10^{-2} М) экстрактом листьев крапивы (*Urtica úrens*) при комнатной температуре.

Композитные частицы $\text{Ag} - \text{SiO}_2$ получали физическими и химическими методами в несколько этапов. В обоих случаях синтез микросфер SiO_2 проводили по методу Штёбера путем щелочного гидролиза тетраэтоксисилана (ТЭОС) в среде этилового спирта и водного раствора аммиака при постоянном перемешивании при 40 °С (мольное соотношение реагентов $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{NH}_3 : \text{H}_2\text{O} : \text{ТЭОС} = 63 : 13 : 4 : 1$). Для получения наноструктурированных покрытий $\text{SiO}_2 - \text{Ag}$ физическим методом мультислои микросфер SiO_2 осаждали на стеклянные подложки методом вертикального осаждения с последующим нанесением кластеров серебра на полученные мультислои распылением ионным пучком в вакууме ($10^{-3} - 10^{-2}$ Па). Для создания композитов $\text{SiO}_2 - \text{Ag}$ с использованием химических подходов проводили пропитку порошка SiO_2 , полученного после центрифугирования и высушивания образца микросфер, нитратом серебра с последующим восстановлением аскорбиновой кислотой (1 М) или иммобилизацию НЧС на поверхности модифицированных аминогруппами микросфер SiO_2 .

Для получения НЧС методом термического разложения водных растворов аммиачного комплекса гидроксида серебра (I) к раствору AgNO_3 (0.1 М) добавляли NaOH (0.5 М) до выпадения осадка Ag_2O черного цвета. После промывания водой осадок растворяли в 10% водном растворе аммиака. Аликвоту полученного комплекса

[Ag(NH₃)₂]ОН различного объема (0.1 – 2.5 мл) добавляли в кипящую воду. Через 20 – 60 мин после начала реакции отбирали пробы золь НЧС и переносили их в пробирки, охлаждаемые холодной водой.

Наноструктурированные покрытия на основе серебра получали методом аэрозольного осаждения. Для этого раствор [Ag(NH₃)₂]ОН, полученный по методике, описанной выше, распыляли в виде аэрозоля на нагретые до 60 – 270 °С подложки различного типа (стекло, Al₂O₃, SiO₂). Время осаждения составляло 30 – 60 мин. Для получения более сложных структур на основе серебра проводили пиролиз [Ag(NH₃)₂]ОН в виде аэрозоля при температурах 750 – 950 °С.

Подготовка биологических образцов. Эритроциты выделяли из артериальной крови самцов крыс линии *Wistar*. Разбавленные до 5000 раз суспензии эритроцитов получали путем двухстадийного разведения крови стандартным физиологическим буфером Алена с рН = 7.2 – 7.4 (145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 4 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, 1 мМ MgSO₄, 1 мМ CaCl₂) с различной осмолярностью, позволяющего сохранить целостность отдельных клеток [7]. Для разведения крови использовали также нитратный буфер, в котором, в отличие от буфера Алена, все хлориды заменены на соответствующие нитраты. Тени эритроцитов и изолированный гемоглобин получали по стандартным методикам [7].

Исследование полученных образцов проводили с использованием комплекса инструментальных методов анализа. Методы РФА, РЭМ, ПЭМ, ПЭМВР, ЛРСА, ИК-спектроскопии, оптической микроскопии, АСМ, ТА, капиллярной конденсации азота применяли для исследования состава и структуры материалов; методы КР-, ГКР-спектроскопии, спектроскопии в УФ- и видимой области – для изучения функциональных свойств материалов.

В третьей главе представлены полученные в ходе исследования результаты и их обсуждение.

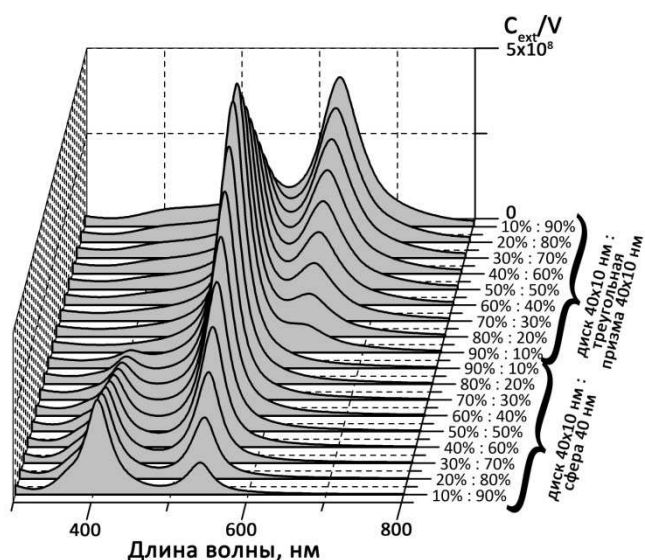


Рис. 1. Результаты моделирования спектров экстинкции НЧС различного размера и морфологий (сферы, диски, треугольные пластинки) методом дискретно-дипольного приближения (ДДП)

Во вступительной части главы обсуждаются факторы, оказывающие влияние на применимость получаемых наноматериалов для ГКР живых клеток. На вид спектров экстинкции, поглощения и рассеяния наибольшее влияние оказывает не только размер НЧ, но и их морфология, что подтверждается моделированием оптических свойств НЧС методом ДДП (рис. 1). Кроме того, обычно при смешивании образцов НЧС разного размера с одной предысторией результирующий спектр поглощения аддитивен спектрам поглощения исходных образцов. Такая вариация оптических свойств позволяет считать НЧС и наноструктуры на их основе уникальным

материалом для биомедицинской диагностики. В то же время, очевидно, что широко распространенные в литературе упрощенные подходы не вполне приемлемы и требуют своего дальнейшего развития.

Любые характеристики оптических свойств ансамбля НЧ являются усредненными и интегральными. При этом природа эффекта ГКР проявляется на нанометровом диапазоне, т.е. на масштабах, сопоставимых с размером индивидуальных НЧ. Действительно, с клеточной мембраной, например, эритроцита, взаимодействуют отдельные НЧС, и только они усиливают сигнал от области, непосредственно прилегающей к этой НЧ на мембране клетки (рис. 2).

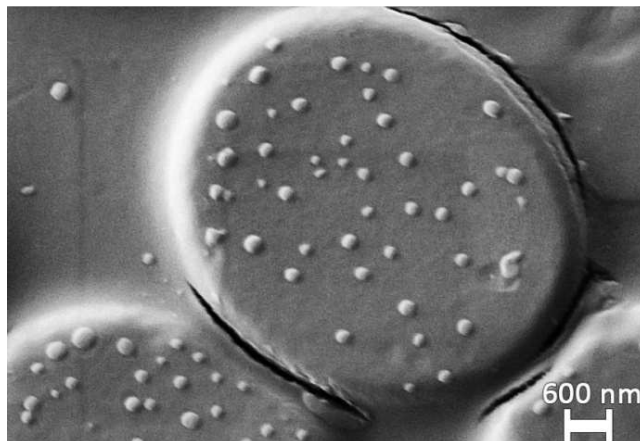


Рис. 2. РЭМ-изображение агрегатов НЧС на поверхности эритроцита

Поэтому, как и в случае «горячих точек»¹ для сверхчувствительного анализа отдельных молекул, при анализе клеток методом ГКР во многих случаях тоже гипотетически может «работать» лишь определенная узкая фракция (2 – 3%) НЧ определенного размера и формы.

Исследования практической применимости эффекта ГКР, в частности, для анализа биологических объектов и, в особенности, для живых клеток, еще не вполне вышли из стадии эмпирического поиска. В связи с этим, важным для достижения целей настоящей поисковой работы становится алгоритм поиска, оптимизации и разработки новых способов получения ГКР-активных наноматериалов, использованный для исключения малопригодных и выявления эффективных приемов их получения.

В разделе, посвященном оптимизации методик получения наноматериалов на основе серебра, приведены результаты, полученные в ходе воспроизведения литературных методик синтеза НЧС, кроме этого, отдельное внимание уделено созданию наноматериалов на основе серебра на примере декорирования микросфер диоксида кремния НЧС с использованием химических и физических подходов.

Для сравнения свойств образцов НЧС сферической морфологии с различной предысторией использовали два метода химического синтеза – метод Леопольда и Лендла и «зеленый». Показано, что подход «зеленой химии» позволяет эффективно и экспрессно получать НЧС со средним размером, по данным ПЭМ, 6 ± 2 нм и стабилизировать их в виде золя. К сожалению, данный метод не применим для ГКР-диагностики в силу потенциально невысокой воспроизводимости выхода и морфологии НЧ при использовании различных растительных экстрактов, а также из-за возникновения артефактов, связанных с наличием сложной смеси органических молекул в большинстве используемых экстрактов.

НЧС анизотропной морфологии (нити, стержни, полиэдрические и пластинчатые частицы) получали с использованием полиольного и цитратного методов. Частицы с

¹ «Горячие точки» – места контакта отдельных НЧ в агрегате – возникают преимущественно в агрегатах НЧ и характеризуются более сильным локальным электромагнитным полем по сравнению с отдельными НЧ.

полиольной предысторией для целей данной работы, к сожалению, оказались не применимы по причине образования смесей частиц различных морфологий с высокой полидисперсностью, а также наличия органических молекул, затрудняющих обнаружение гемоглобина и исследование живых эритроцитов методом ГКР. Тем не менее, было обнаружено, что при выдерживании частиц с полиольной предысторией в течение нескольких недель в растворе аммиака наблюдалось формирование поверхностно-декорированных НЧС.

Для получения нанопластинок серебра использовали цитратный метод. Данные ПЭМ (рис. 3, б) и РЭМ подтверждают, что основным продуктом синтеза являются НЧС в виде пластинок толщиной 12 ± 2 нм с малым содержанием частиц других форм (табл. 1).

Таблица 1. Основные характеристики ряда образцов нанопластинок серебра

Характеристики НЧС (морфология, размер)	Образец НЧС, полученный с использованием затравок с указанной объемной долей, %			
	6	6 (+ 1% NaCl)	19	48
Пластинки, %	77	52	88	86
в т.ч. треугольные, %	14	1	10	24
в виде дисков, %	86	99	90	76
Сферические частицы, %	15	34	9	12
Частицы других морфологий (эллипсоиды, шестиугольники), %	8	14	3	2
Средний размер пластинок (ПЭМ), нм	40.8 ± 6.3	32.9 ± 4.0	26.5 ± 3.0	15.4 ± 2.0

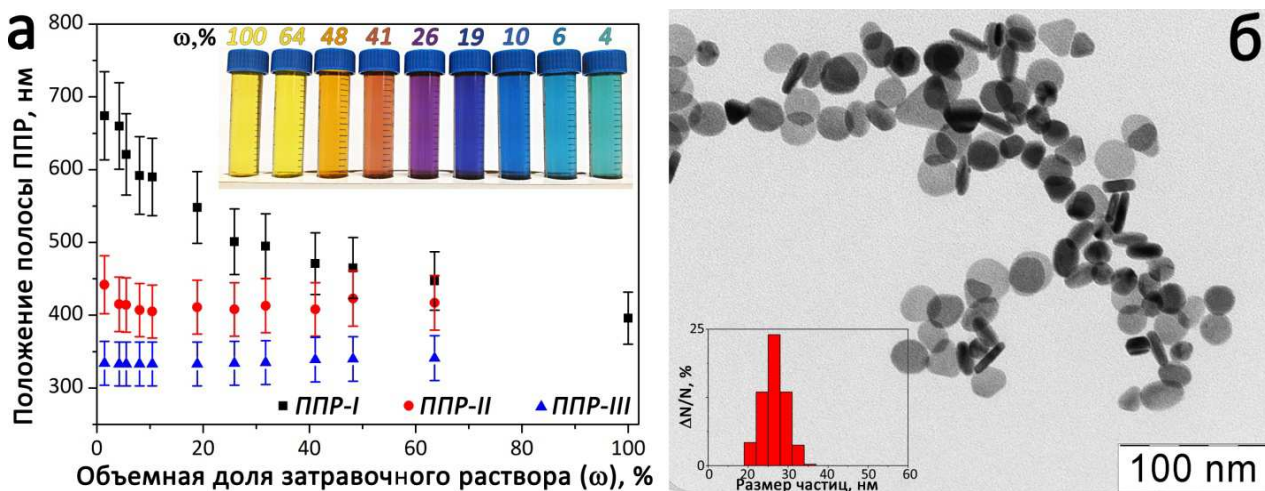


Рис. 3. Зависимость положения полос ППР пластинок – мода дипольного (ППР-I) и квадрупольных (ППР-II, ППР-III) резонансов – от объемной доли затравочного раствора. На вставке – фотография, демонстрирующая цвет золь НЧС, полученных с использованием различной доли затравочного раствора (а). ПЭМ-изображение типичного образца (объемная доля затравок – 19%) (б).

В спектрах поглощения пластинок серебра экспериментально наблюдается три полосы ППР (рис. 3, а): мода с резонансом в более длинноволновой области соответствует дипольному резонансу, две другие моды – квадрупольному. При уменьшении объема аликвоты затравок при синтезе пластинок происходит увеличение латерального размера пластинок и происходит «красный сдвиг» на спектрах поглощения золь (рис. 3). Установлено, что добавление NaCl приводит к изменению формы частиц (табл. 1), а, следовательно, вида спектра поглощения и резкому смещению полос ППР в

коротковолновую область, что связано с процессами спонтанной рекристаллизации нанопластинок.

В настоящей работе композитные частицы $\text{SiO}_2 - \text{Ag}$ получали с использованием двух подходов – химического и физического. В результате гидролиза ТЭОС были получены практически монодисперсные микросферы, образованные гидратированным аморфным SiO_2 . Механизм реакции гидролиза приводит к образованию микроканалов в структуре микросфер и формированию определенной системы пор, общий объем которых, по данным капиллярной конденсации азота, варьируется в пределах $3.5 - 7.5 \cdot 10^{-8} \text{ м}^3/\text{г}$ (в зависимости от температуры отжига микросфер – $110 - 300^\circ\text{C}$). Используя данные микрочастицы в качестве микроконтейнеров, была осуществлена их пропитка водным раствором AgNO_3 с последующим восстановлением Ag^+ аскорбиновой кислотой. По данным ПЭМ, композитные частицы представляют собой микросферы SiO_2 размером $240 \pm 12 \text{ нм}$, декорированные НЧС размером $5 - 40 \text{ нм}$. Образцы частиц $\text{SiO}_2 - \text{Ag}$ демонстрируют полосы ППР при ~ 390 и $\sim 450 \text{ нм}$, что обусловлено наличием НЧС различных размеров. Имобилизация НЧС на функционализированной аминогруппами поверхности микросфер SiO_2 , обусловленная электростатическим взаимодействием (по данным ДРС, ζ -потенциалы модифицированного аминогруппами SiO_2 и золя НЧС составляют $+10 \pm 1 \text{ мВ}$ и $-31 \pm 2 \text{ мВ}$, соответственно), приводит к аналогичным результатам.

Детальное исследование наноструктурированных подложек на основе композитных частиц $\text{SiO}_2 - \text{Ag}$ с эффектом плазмонного резонанса выявило взаимосвязь оптических свойств и морфологии агрегатных структур НЧС на фотоннокристаллической структуре, полученной самосборкой микросфер SiO_2 . Варьирование режимов осаждения кластеров серебра путем ионного распыления в вакууме (рис. 4) позволяет получить пленки с различными морфологическими особенностями и закономерно изменяющимися оптическими свойствами (спектрами поглощения, демонстрирующими полосы ППР, рис. 4, а, на вставке).

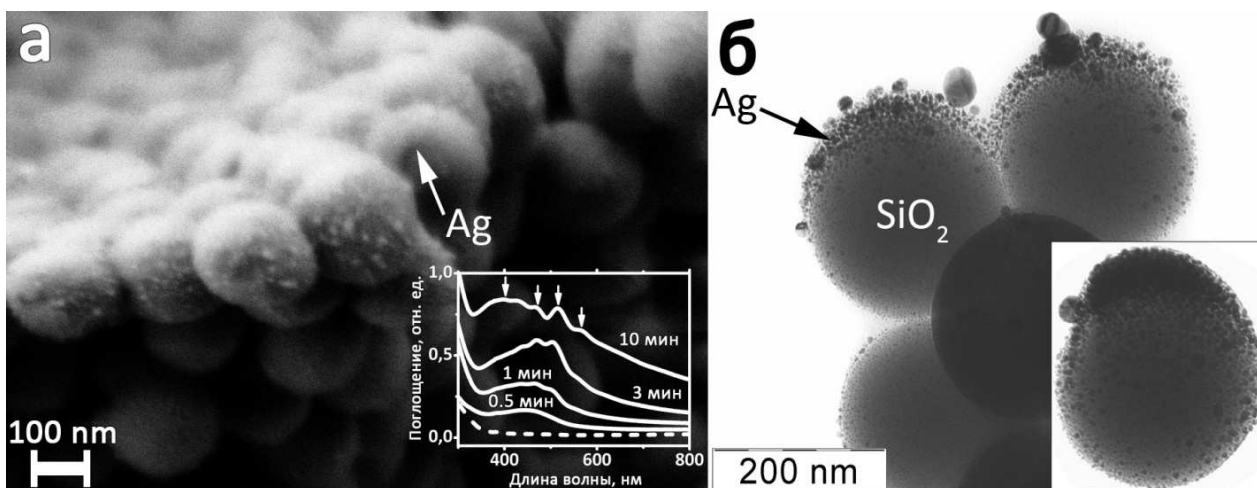


Рис. 4. РЭМ- (а) и ПЭМ-изображения (б) типичных образцов композитных частиц $\text{SiO}_2 - \text{Ag}$, полученных с использованием физического подхода. Параметры напыления: угол между подложкой и мишенью – 0° (а, на вставке б), 90° (б); время напыления – 10 мин (а, б). На вставке а – спектры поглощения композитных пленок при различном времени напыления.

Высокое пересыщение при осаждении приводит к вынужденному формированию кластеров серебра размером 1–3 нм, сопоставимых по размеру с зародышевыми кристаллами и осаждающихся на любой доступной поверхности, имеющей температуру, достаточно низкую для конденсации распыляемого «облака» серебра (плазмы, содержащей ионы и кластеры серебра).

Качественный анализ спектров поглощения образцов показывает, что увеличение времени напыления приводит к плавному увеличению интенсивности полосы ППР и смещению ее в область больших длин волн (470 – 485 нм). Это согласуется с простой моделью увеличения степени покрытия микросфер НЧ и с постепенным увеличением их среднего размера. В ряде случаев это приводит к формированию асимметричных диэлектрических микрочастиц-«янусов», покрытых с одной стороны (по одной полусфере) проводящим слоем серебра, контактирующим с соседними микрочастицами в слое (рис. 4, б). В связи с этим, такие частицы характеризуются наличием, как минимум, четырех полос ППР (400, 470, 515, 565 нм).

Таким образом, создание нанокомпозитов открывает широкие возможности для получения поверхностно-наноструктурированных пленок с НЧС и их агрегатами, оптические свойства которых могут изменяться в широких пределах из-за наличия взаимодействий как внутри агрегатов, так и в самом поверхностном слое. Тем не менее, в наибольшей степени данные подложки применимы только к анализу отдельных молекул, однако не приспособлены к созданию устройств типа лабораторий на чипе для ГКР-спектроскопии живых клеток в силу высокой гидрофобности поверхности.

Раздел, посвященный исследованию физико-химических процессов, протекающих при старении коллоидных растворов серебра, включает изучение процессов старения НЧС, рекристаллизации НЧС в виде пластинок и разработку методов получения поверхностно-декорированных НЧС.

Процессы старения коллоидных растворов с течением времени исследовали на примере НЧС, полученных по методу Леопольда и Лендла при различных температурах (25 – 60 °С) (табл. 2).

Таблица 2. Основные характеристики образцов НЧС, полученных при различных температурах и продолжительности старения.

Тип НЧС Параметр	НЧС – 25°С		НЧС – 40°С		НЧС – 60°С	
	1 день	2 месяца	1 день	2 месяца	1 день	2 месяца
Средний размер частиц (ПЭМ), нм	9 ± 1; 47 ± 5	42 ± 3; 71 ± 7	88 ± 9	29 ± 3; 82 ± 9	32 ± 5; 74 ± 8	55 ± 6; 103 ± 12
Средний размер частиц (ДРС), нм	13 ± 1; 84 ± 8	14 ± 1; 80 ± 7	111 ± 10	110 ± 10	123 ± 12	171 ± 18
ζ-потенциал, мВ	-32.7 ± 0.7	-35.4 ± 0.8	-42.6 ± 0.8	-41.6 ± 0.8	-46.1 ± 0.9	-42.6 ± 0.7
Аспектное соотношение	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.3	1.4 ± 0.3
Максимум ППР, нм	415 ± 4		444 ± 5		432 ± 5	

Согласно данным ПЭМ, установлено, что при увеличении температуры синтеза и продолжительности старения гидрозолей наблюдается общая тенденция уширения кривой распределения НЧС по размерам (табл. 2). Кроме того, с течением времени увеличивается аспектное соотношение частиц, но при этом не изменяется положение максимума полосы ППР и не происходит коагуляции золя, что подтверждается данными измерений ζ -потенциала (табл. 2). Помимо этого, при повышении продолжительности старения в золях образуются кристаллы хлорида серебра из-за присутствия остаточных количеств хлорид-ионов в растворе.

Таким образом, критически важной для получения НЧС методом Леопольда и Лендла является температура синтеза, что связано с изменением скорости зародышеобразования. В результате синтеза формируются, в основном, сферические частицы с широким распределением по размеру. Как следствие, данный метод не позволяет существенно смещать полосу ППР.

Влияние электролитного состава буферного раствора при проведении анализа биологических объектов выражается в образовании крупных агрегатов НЧС, а также в увеличении размеров НЧ при длительном хранении. Оба фактора являются источником плохой воспроизводимости результатов ГКР-анализа при использовании НЧС, полученных данным методом синтеза, хотя такие НЧС не демонстрируют ярко выраженной токсичности и обладают достаточной ГКР-активностью. Метод может быть ограниченно использован для анализа биологических объектов.

При исследовании процессов «старения» НЧС в виде пластинок, показано влияние Cl^- -ионов на морфологию НЧС. Добавление NaCl приводит к необратимому изменению формы частиц (табл. 1), при этом в спектрах поглощения происходит резкое смещение полос ППР в синюю область (рис. 5). Полученные данные дают возможность предположить, что Cl^- -ионы приводят не к агрегации, а к спонтанной рекристаллизации частиц, выражающейся в растворении вершин треугольных пластинок и переосаждении вещества на плоские грани бывших пластинок, что снижает анизотропию формы НЧ.

Таким образом, цитратный метод является эффективным способом получения НЧС анизотропной формы, позволяя смещать полосу ППР в широком диапазоне, по крайней мере, в пределах 390 – 690 нм, что достаточно трудно достичь с использованием других подходов. Полученные золи и их оптические свойства воспроизводимы и стабильны, по крайней мере, в течение года при хранении при комнатной температуре. Эта уникальная особенность открывает возможность гибкой «подстройки» под практически любые анализируемые биологические объекты и длины волн используемого лазерного излучения. При этом основное преимущество метода –

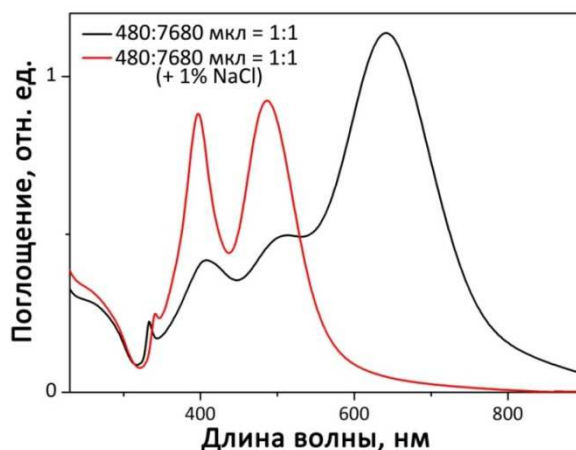


Рис. 5. Спектры поглощения смеси образцов пластинок, приготовленных с использованием затравочного раствора с объемной долей 4% и 41%, до и после добавления NaCl .

анизотропия формы НЧ – может быть в существенной степени нивелировано при контакте с хлорид-содержащими биологическими буферами, что требует соблюдения определенных ограничений на состав контактирующей с НЧ жидкой фазой. Кроме того, «цитратные» золи не лишены обычного недостатка большинства химических методов получения, связанного с наличием следов стабилизаторов, токсичной борной кислоты, ионов натрия, продуктов окисления аскорбиновой кислоты и т.д., что требует дополнительной стадий очистки. В качестве дополнительного методического приема, способного улучшить качество ГКР-диагностики, выступает осаждение специально подобранной смеси частиц различного размера и формы на пористый целлюлозный носитель, а также использование нитратного буфера.

В части, посвященной разработке методов получения поверхностно-декорированных НЧС, описан новый метод получения таких частиц в процессе старения золь в водном растворе аммиака в присутствии кислорода воздуха (рис. 6). Предложена модель процесса образования поверхностно-декорированных НЧС, включающего три стадии: 1) окисление металлического серебра кислородом воздуха, 2) стабилизацию серебра (I) путем образования $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ и его накопление в системе, 3) постепенное превращение комплекса в серебро в результате восстановления, протекающее с уменьшением концентрации аммиака с течением времени.

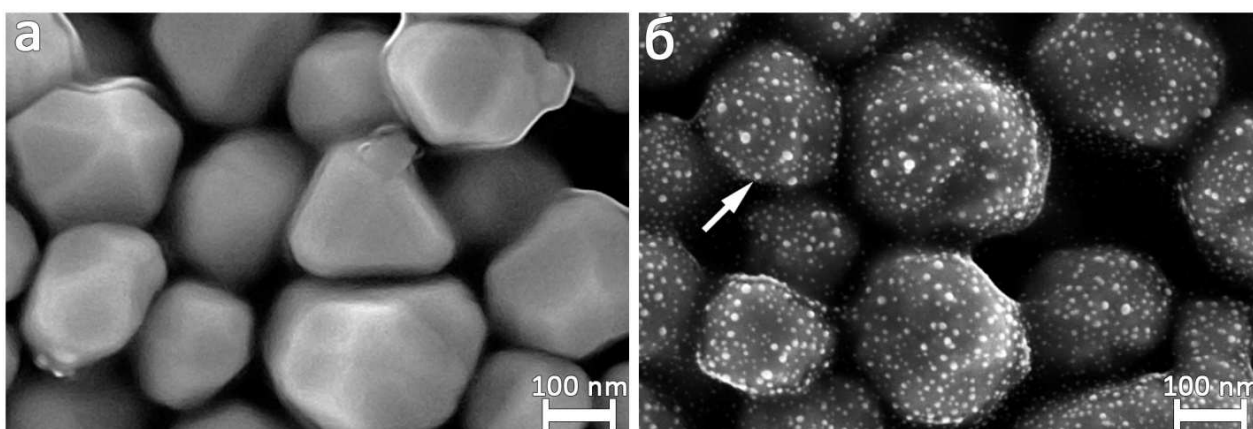


Рис. 6. РЭМ-изображение контрольного образца частиц серебра с полиольной предысторией (время выдерживания – 27 дней) (а) и образца поверхностно-декорированных частиц серебра (12 дней) (б). Стрелкой обозначены вторичные НЧС, декорирующие поверхность исходных полиэдрических частиц.

Таким образом, полиольный метод позволяет получать широкий набор НЧС со сложной морфологией. К сожалению, данный метод с трудом применим для ГКР-диагностики по причине достаточно большого размера получаемых частиц серебра (> 80 – 100 нм) и блокировки их поверхности молекулами стабилизатора, так и компонентами жидкой органической фазы, в которой проводился синтез.

В разделе, касающемся разработки новых методов синтеза наноструктурированных материалов на основе серебра, обсуждаются оригинальные методы, основанные на разложении аммиачного комплекса гидроксида серебра (I). Золи НЧС, не содержащие органических молекул, поверхностно-активных веществ (ПАВ),

стабилизаторов, были получены при определенной концентрации серебра и контролируемом времени разложения комплекса в кипящей воде (рис. 7).

Образование НЧС может быть описано протеканием следующих реакций: 1) осаждение оксида серебра (I): $2\text{AgNO}_3 + 2\text{NaOH} = \text{Ag}_2\text{O} + 2\text{NaNO}_3 + \text{H}_2\text{O}$, 2) получение аммиачного комплекса: $\text{Ag}_2\text{O} + 4\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} = 2[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$, 3) разложение комплекса при 90°C : $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH} \leftrightarrow \text{Ag}^+ + 2\text{NH}_3 + \text{OH}^-$, $3\text{Ag}^+ + \text{NH}_3 + 3\text{OH}^- = 3\text{Ag} + \frac{1}{2}\text{N}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$.

По данным ПЭМ, в результате разложения $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ образуются преимущественно сферические НЧС с бимодальным распределением по размерам (рис. 7, а). Помимо основной фракции НЧС со средним размером 1 – 5 нм, в образцах также присутствует небольшое количество НЧС размером 20 – 30 нм, некоторые из которых имеют дефекты двойникования. Агрегации НЧС не наблюдалось. Показано, что полученные гидрозоли характеризуются различным распределением частиц по размерам, согласно данным ДРС (рис. 7, б), и демонстрируют различные оптические свойства (рис. 7, в). Интенсивность полос ППР повышается с увеличением продолжительности синтеза и ростом количества добавленного $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$, что объясняется большим количеством рассеивающих / поглощающих центров в золях. В то же время увеличение размера частиц, наблюдаемое по данным ДРС, приводит к «красному сдвигу» полосы ППР (рис. 7, б, в). В работе также показано, что при выдерживании золь при комнатной температуре в течение, по крайней мере, 2 недель седиментации не наблюдается. Кроме того, замораживание коллоидных растворов при -15°C и их выдерживание в течение 15 дней с последующей разморозкой и ультразвуковой обработкой в течение 10 мин приводит к практически полному восстановлению спектров поглощения.

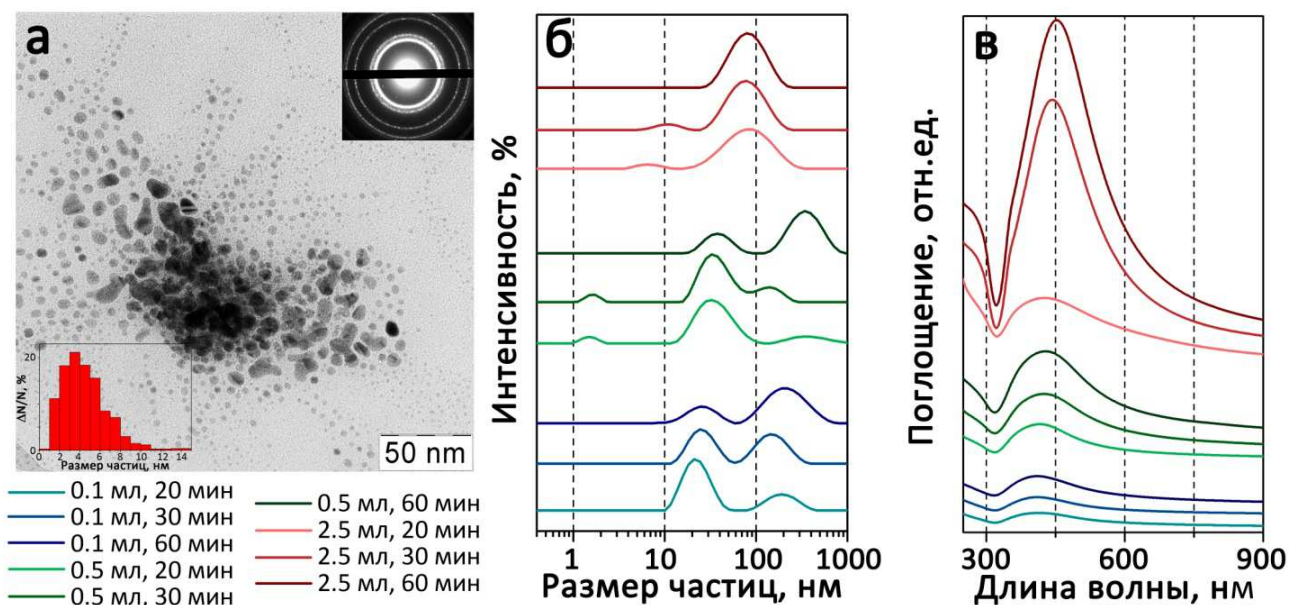


Рис. 7. Типичное ПЭМ-изображение и электронная дифракция (на вставке вверху) и распределение частиц по размерам (на вставке внизу) образца НЧС (а). Данные ДРС (б) и спектры поглощения (в) НЧС, демонстрирующие зависимость размера НЧС от времени реакции и количества $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$, введенного в реакционную среду.

Таким образом, данный метод позволяет получить «чистые» гидрозоли серебра. Подобные образцы перспективны в области ГР-спектроскопии биологических объектов

ввиду высокой воспроизводимости метода синтеза, отсутствия побочных продуктов, возможности получения стабильных золей с эффективным поглощением и асимметричной полосой ППР и отсутствия токсического действия на биоаналиты.

Для получения наноструктур серебра, имеющих сложную морфологию, предложено использовать метод ультразвукового пиролиза аэрозолей $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ при температурах $750 - 900^\circ\text{C}$. Среди полученных данным методом материалов наблюдаются пористые сфероиды, дендритные структуры, кубы (рис. 8). Подобные наноструктурированные материалы могут быть использованы для ГКР-исследования живых клеток. Образцы НЧС собирали с трех различных участков: непосредственно на выходе из горячей зоны, при конденсации водяных паров, содержащих частицы серебра, на предварительно нагретые до $200 - 250^\circ\text{C}$ подложки. Независимо от выбранной зоны, наноструктуры представляют собой металлическое серебро и демонстрируют ярко выраженные плазмонные свойства, связанные с наличием НЧС.

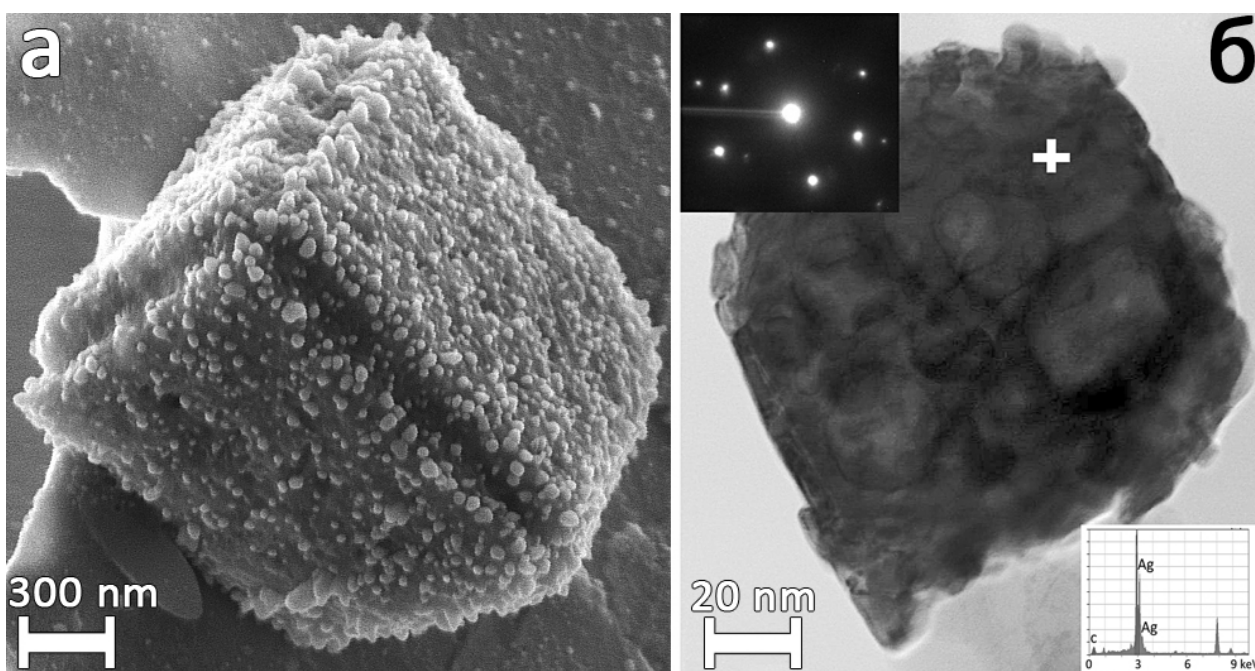


Рис. 8. Различные типы кубов серебра, поверхность которых декорирована НЧС. РЭМ-изображения куба, грани которого покрыты НЧС серебра (а). ПЭМ-изображение, электронная дифракция (на вставке сверху) и данные ЛРСА (на вставке внизу) отдельной кубической частицы (б).

Образование агрегатов частиц в виде полиэдров является следствием формирования первичных частиц Ag_2O в каплях аэрозоля. Ag_2O склонен к образованию кубических, октаэдрических (в т.ч. усеченных) и других структур. Разложение оксида приводит к образованию полиэдрических структур серебра с порами, возникающими за счет выделения кислорода (рис. 8). Полученные наноструктурированные материалы являются ГКР-активными, что продемонстрировано на примере модельного объекта – родамина 123 – и эритроцитов в интактном состоянии. ГКР-спектры родамина 123 были зарегистрированы при низких концентрациях аналита (10^{-10} М) в присутствии золя НЧС, полученного в результате пиролиза аэрозолей при 750°C , что является ожидаемым результатом для НЧС со сложной морфологией.

Для создания ГР-активных материалов (рис. 9) был предложен метод разложения $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ непосредственно на подложках, нагретых до 200 – 270 °С с использованием аэрозольного осаждения. Микроструктура наноструктурированных пленок характеризуется наличием типичных элементов в форме пересекающихся концентрических колец, состоящих из металлического серебра. Кроме этого, они имеют иерархическую структуру и состоят из пористой серебряной матрицы, содержащей ограниченные НЧС типа «кунжутных зерен» размером 10 – 50 нм (рис. 9, а – в).

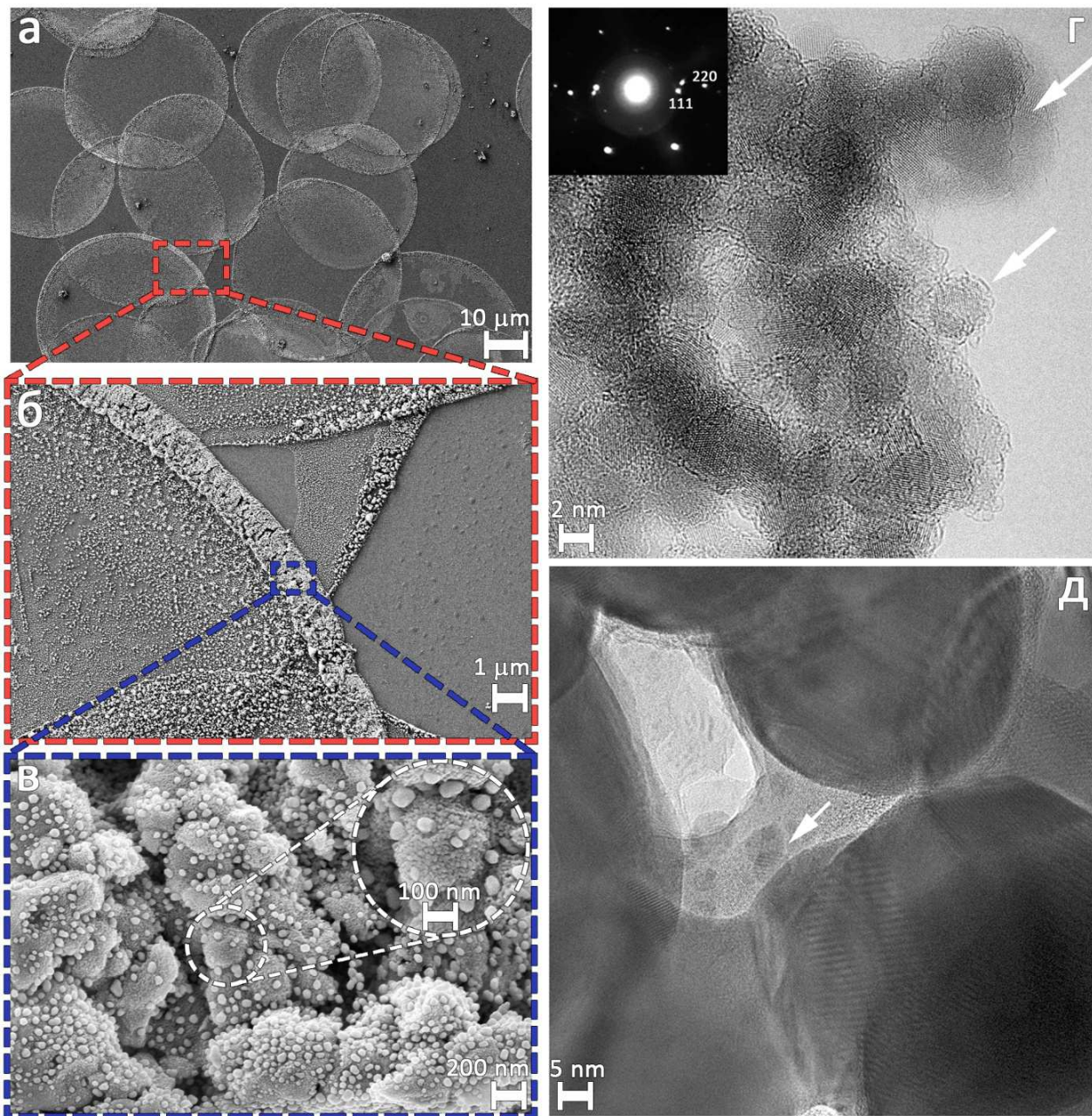


Рис. 9. РЭМ- (а, б, в) и ПЭМВР-изображения (г, д) иерархической структуры наноструктурированных покрытий на основе серебра, полученных методом аэрозольного осаждения. На вставке (г) – электронная дифракция НЧС. ПЭМВР-изображение области между НЧС в пористой матрице (д). Стрелками обозначены НЧС (г, д).

Сложная морфология наноструктурированных пленок серебра обусловлена описанным в литературе эффектом «кофейных колец» [8], который заключается в том, что при высыхании капли частицы располагаются не равномерно по поверхности твердого тела, а

концентрируются у границ. В процессе высыхания капиллярный поток, направленный от центра капли к ее границам, переносит взвешенные частицы к краю капли. В ходе испарения концентрация частиц вдоль исходной границы капли растет. Как только образовавшиеся НЧС перемещаются к границе капли, они формируют неплотно упакованные квазисимметричные структуры вблизи границы кольца. Такие структуры не позволяют взвешенным частицам достигнуть границы капли и способствуют более равномерному осаждению. Таким образом, в результате образуется пленка из пересекающихся серебряных колец.

Согласно данным ПЭМ и электронной дифракции, условия получения, такие как температура и время аэрозольного осаждения, играют важную роль в процессе образования наноструктур. При низких температурах (60 °С) образуются кольца, состоящие из не полностью разложившегося Ag₂O. Микроструктура таких образцов характеризуется наличием стенок, состоящих из Ag₂O и имеющих пористую структуру с относительно небольшим количеством НЧС размером 3 – 30 нм. Электронная дифракция демонстрирует наличие, по крайней мере, двух фаз, включая металлическое серебро и оксид серебра (I). При высоких температурах (270 °С) формируется матрица в виде пористой серебряной структуры («серебряная губка») с включенными в нее «кунжутными зернами» (рис 9, г, д). Показано, что наноструктурированные поверхности, полученные при температуре выше 60 °С, не содержат Ag₂O и другие продукты.

Макроскопически, физико-химические методы анализа, РФА и абсорбционная спектроскопия (рис. 10), подтверждают наличие в наноструктурах фаз и состояний, найденных микроскопически.

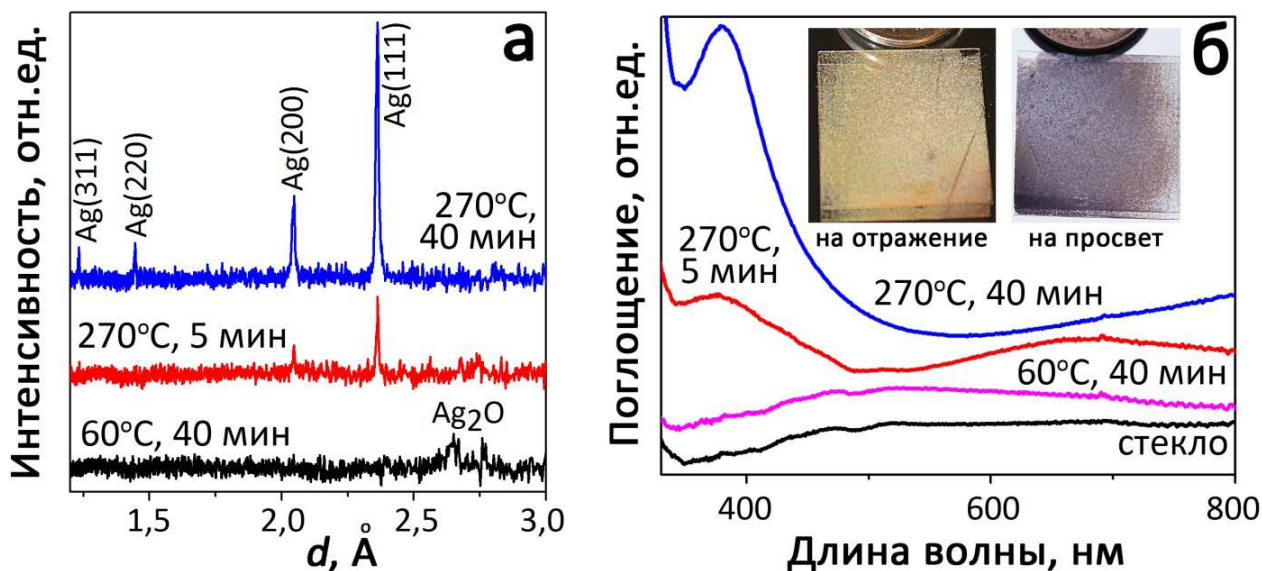


Рис. 10. Дифрактограммы (а) и спектры диффузного отражения (б) наноструктурированных покрытий на основе серебра, осажденных на подложки при различной температуре и с различным временем осаждения. На вставке (б) – макроскопический вид наноструктурированных покрытий на основе серебра, нанесенных на покровные стекла размером 1,5 x 1,5 см и имеющих различную окраску в отраженном и проходящем свете.

В частности, по данным РФА, в образцах, полученных при 270 °С, присутствует только кубическая модификация серебра (Fm $\bar{3}$ m) (рис. 10, а). В спектрах диффузного отражения

образцов наблюдаются полосы ППР, свидетельствующие о наличии НЧС (рис. 10, б). Полосы ППР асимметричны, характеризуются наличием длинного «хвоста» в длинноволновой области, что связано с иерархической природой наноструктур (рис. 10, б).

Таким образом, метод разложения аммиачного комплекса гидроксида серебра (I) оказался универсальным приемом, позволяющим получить фактически всегда в одну стадию как электростатически стабилизированные гидрозоли отдельных НЧС, так и частицы сложной формы, а также наноструктурированные покрытия с иерархической структурой. Во всех случаях формируется наноматериал на основе серебра без примесей катионов, мешающих анионов или молекул ПАВ, что является уникальной особенностью данного метода. При формировании наноструктурированных покрытий достигается шероховатость поверхности, достаточная для иммобилизации живых эритроцитов, при этом сама наноструктура не демонстрирует признаков изменения под действием буфера и клеточных структур и не воздействует негативно на живые клетки. Кроме того, иерархичность наноструктуры может приводить, согласно известному эффекту «фокусировки плазмонов», к расширению диапазона масштабов, на котором происходит усиление сигнала КР за счет локального электромагнитного поля. В силу указанных причин, полученные подложки являются новым, оригинальным материаловедческим решением, способствующим развитию методов неинвазивной диагностики.

Раздел, посвященный исследованию токсичности наноматериалов, демонстрирует, что полученные наноструктурированные покрытия на основе серебра, приведенные в непосредственный контакт с эритроцитами, не вызывают разрушения эритроцитов в условиях проведения ГКР-измерений (рис. 11).

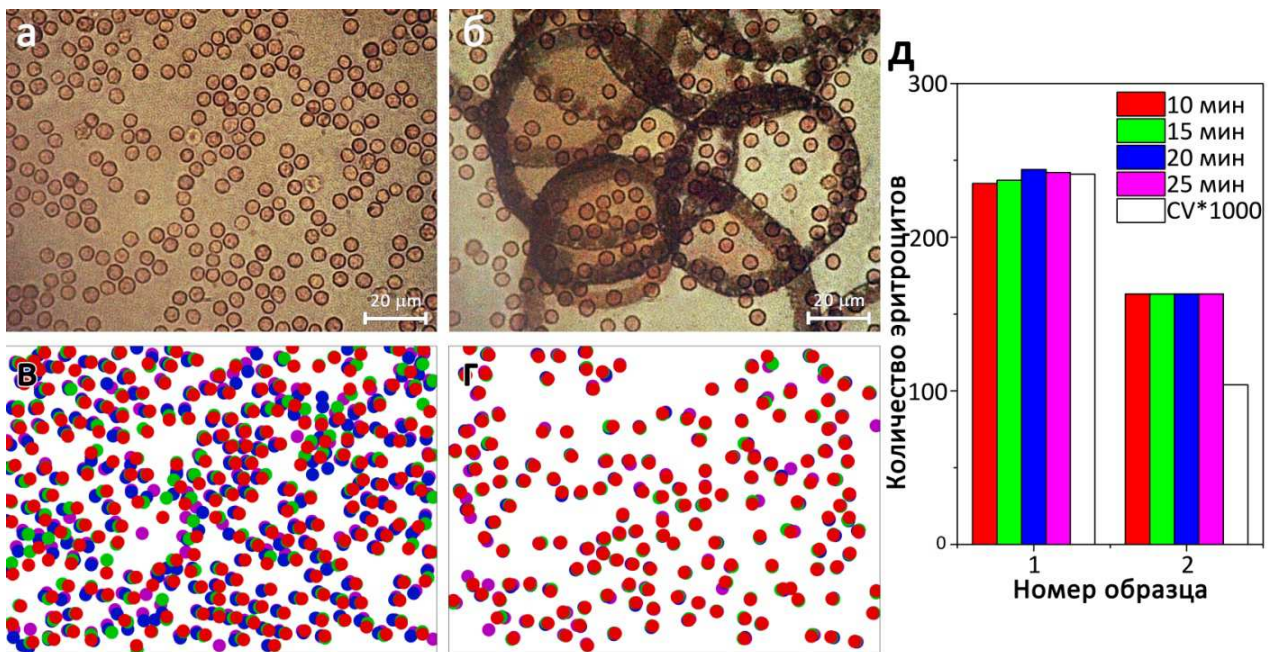


Рис. 11. Суспензия эритроцитов в буфере Алена, нанесенная на предметное стекло (а), на наноструктурированные покрытия с отдельными серебряными кольцами, полученными при 270 °С и временем осаждения 5 мин (б). Карты (в, г) визуализируют положение эритроцитов на каждом из типов подложек (а, б), соответственно, с течением времени: 10 (красные точки), 15 (зеленые), 20 (синие) и 25 мин (фиолетовые). Статистические данные (д). Цвет столбцов на диаграмме соответствует цветам (в, г), белым цветом обозначены коэффициенты вариации (CV) количества клеток.

Эритроциты, приведенные в физический контакт с серебросодержащими наноструктурированными покрытиями, остаются неповрежденными в течение, по крайней мере, 40 мин, что минимум в 2 раза превышает продолжительность проведения серий ГКР-измерений образцов (рис. 11, б). Количество клеток на подложках в течение всего периода подсчета (25 мин) остается постоянным, что проиллюстрировано на рис. 11, д. Кроме того, шероховатые наноструктурированные подложки (рис. 11, б) позволяют иммобилизовать эритроциты, в то время как гладкие стеклянные подложки без нанесенного серебра (рис. 11, а) не могут предотвратить случайных перемещений красных кровяных телец, обусловленных броуновским движением. Наконец, данные наблюдения позволяют утверждать, что сигнал ГКР от эритроцитов в случае использования наноструктурированных подложек регистрируется от гемоглобина (Гб), находящегося внутри клеток, т.к. число клеток остается постоянным в течение эксперимента и на подложках не происходит разрушения клеток с высвобождением Гб, поэтому между наноструктурами серебра и молекулами Гб не возникает прямого контакта: они находятся на расстоянии, равном толщине мембраны (порядка 10 нм).

В заключительном разделе главы обсуждается разработка методик спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния на биологических объектах. Среди полученных в настоящей работе наноматериалов на основе серебра для исследования живых эритроцитов наибольший интерес представляют покрытия в виде кольцевых наноструктур серебра.

Особенностью эритроцитов является то, что они содержат гемоглобин двух типов – цитоплазматический (Гб_{цит}) и мембраносвязанный (Гб_{мс}) (рис.12) [7]. Обычная спектроскопия КР при исследовании клеток крови позволяет зарегистрировать спектры Гб_{цит}, т.к. вклад Гб_{мс} незначителен ввиду того, что его концентрация очень мала (< 0,5% от концентрации Гб_{цит}). В случае ГКР-спектроскопии усиление сигнала КР происходит от Гб_{мс}, расположенного в непосредственной близости к наноструктурам серебра.

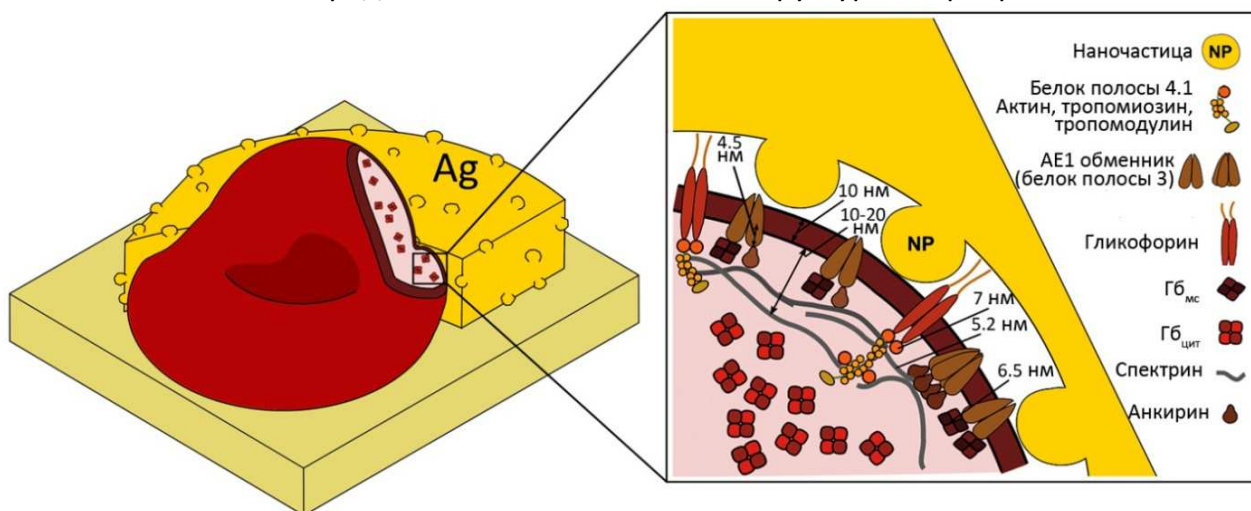


Рис. 12. Модель эритроцита, расположенного на наноструктурированной серебряной стенке кольца. На вставке показано увеличенное изображение примембранной структуры эритроцита, иллюстрирующее расположение серебряных стенок в непосредственной близости к Гб_{мс} (б).

ГКР-активность наноструктурированных покрытий на основе серебра представлена на рис. 13 в виде нескольких групп спектров, усредненных по 20 измерениям и соответствующих образцам разбавленной крови, теней эритроцитов² и изолированного Гб. Образцы наносили на подложки в виде капель суспензии.

При разбавлении крови интенсивность обычного КР-сигнала падает: для образца крови, разбавленного в 3000 раз, КР-спектр отсутствует (рис. 13). Это свидетельствует о том, что спектр КР сильно разбавленных образцов не может быть зарегистрирован без ГКР-активной подложки.

Лазерное излучение с оптимально подобранной мощностью (~0.2 мВт) позволяет сохранить эритроциты в живом состоянии. При увеличении мощности лазера в 20 раз наблюдается термическое повреждение эритроцитов, спектр которых представлен на рис. 13. Оптимальная мощность лазерного излучения дает возможность регистрировать несколько ГКР-спектров последовательно с одной области без повреждения эритроцитов (рис. 13).

Воспроизводимость ГКР-спектров зависит от заданной температуры и продолжительности разложения аммиачного комплекса гидроксида серебра (I) при получении таких подложек, т.к. варьирование плотности расположения колец может привести к изменению спектра. Если условия получения подложек фиксированы, то наблюдается хорошая воспроизводимость спектров (~85%). ГКР-исследования изолированного Гб и теней эритроцитов в присутствии наноструктурированных покрытий на

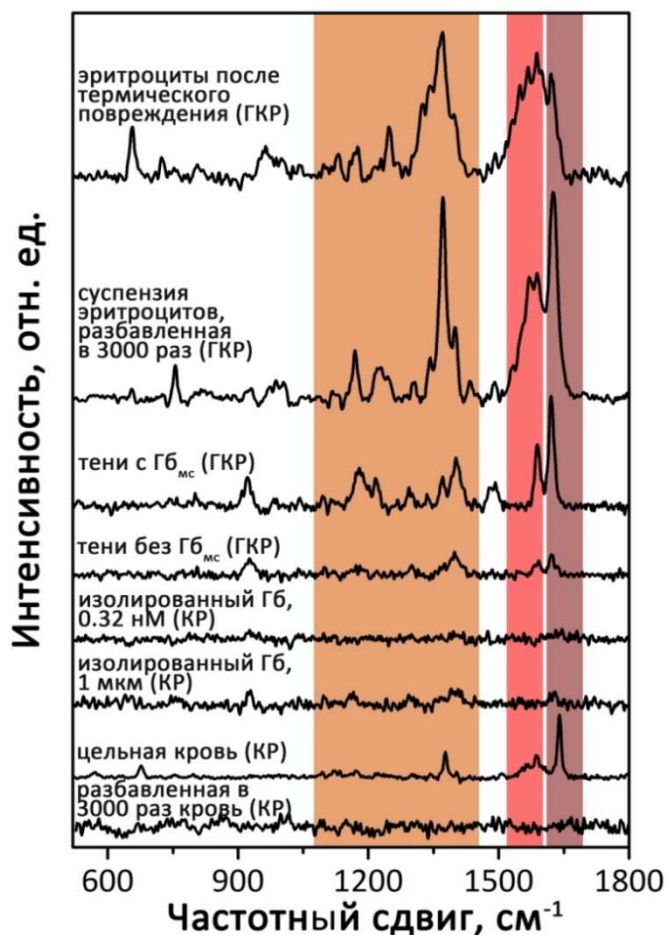


Рис. 13. Типичные КР- и ГКР-спектры эритроцитов, теней эритроцитов и изолированного гемоглобина (Гб). Для регистрации спектров КР в качестве подложек использовали предметное стекло, ГКР – наноструктурированные покрытия на основе серебра. Цветом обозначены характеристические колебания связей порфиринового комплекса железа (рис. 14) ($\lambda_{\text{лазера}} = 514 \text{ нм}$).

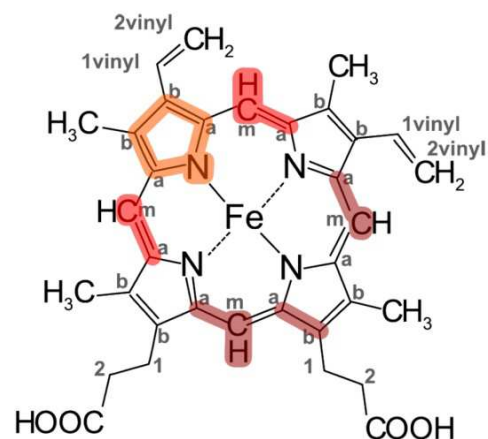


Рис. 17. Схема порфиринового комплекса железа.

² Тени эритроцитов представляют собой закрытые везикулы, образованные плазматической мембраной эритроцитов, в которых отсутствует Гб_{цит} и содержится разное количество Гб_{мс}.

основе металлического серебра показали, что наблюдаемые ранее ГКР-спектры отвечают колебаниям Гб_{мс} (рис. 13).

Концентрация Гб 1 мкМ соответствует количеству свободного Гб, присутствующего в плазме крови, в то время как в 3000 раз меньшая концентрация (0.33 нМ) имитирует ожидаемое количество Гб в образцах эритроцитов, используемых для ГКР-экспериментов. ГКР-спектры отсутствуют в обоих случаях.

Кроме этого, тени эритроцитов с низким содержанием Гб_{мс} демонстрируют слабый ГКР-сигнал с характеристическими пиками Гб. В отличие от них, тени эритроцитов с Гб_{мс}, взятые в концентрации, соответствующей нативным количествам, имеют интенсивный ГКР-сигнал, сходный с ГКР-спектром эритроцитов (рис. 13).

ГКР-спектры живых эритроцитов (рис. 13) соответствуют усиленному сигналу КР Гб_{мс} и демонстрируют тот же набор пиков, что и в случае КР-спектров эритроцитов. Небольшие различия в форме пиков теней и эритроцитов могут быть вызваны частичным вкладом фракции Гб_{цит}, расположенного вблизи плазматической мембраны, если учесть, что усиление сигнала КР в присутствии НЧС может наблюдаться на расстояниях больше 10 нм. Спектр КР Гб_{цит} характеризуется тремя основными пиками, отвечающими симметричным колебаниям пиридиновых колец (пик при 1365 см⁻¹, симметрия A_{1g}) и колебаниям метиновых мостиков (1588 и 1640 см⁻¹, A_{2g} и B_{1g}, соответственно) гема (рис. 14). В ГКР-спектрах Гб_{мс} эритроцитов на наноструктурированных подложках с кольцевыми структурами обычно наблюдается наиболее интенсивный пик при 1370 – 1375 см⁻¹, а также два перекрывающихся пика в области 1560 – 1588 и 1620 – 1630 см⁻¹, в связи с усилением характеристических пиков КР, расположенных при 1550, 1564, 1588 см⁻¹ и 1622, 1640 см⁻¹, соответственно. Некоторые различия в форме и интенсивности пиков в КР- и ГКР-спектрах эритроцитов могут быть вызваны различной ориентацией гема Гб_{мс} по отношению к ГКР-активным наноструктурам серебра.

В случае биомолекул, расположенных внутри клеток, физического контакта между НЧ и аналитом не происходит, в связи с чем доминирующее влияние на механизм усиления КР-

сигнала оказывает увеличение локального электромагнитного поля. Поверхность плазматической мембраны эритроцитов не содержит каких-либо микроворсинок и не покрыта толстым слоем гликокаликса, таким образом, наноструктурные элементы подложки напрямую соприкасаются с плазматической мембраной (рис. 15, 12).

АСМ-изображение эритроцитов показывает, что внешняя поверхность плазматической мембраны клеток покрыта своеобразными наноразмерными «бугорками» и углублениями глубиной 1 – 5 нм и диаметром 10 – 100 нм. Подобные углубления, вероятно, являются наиболее

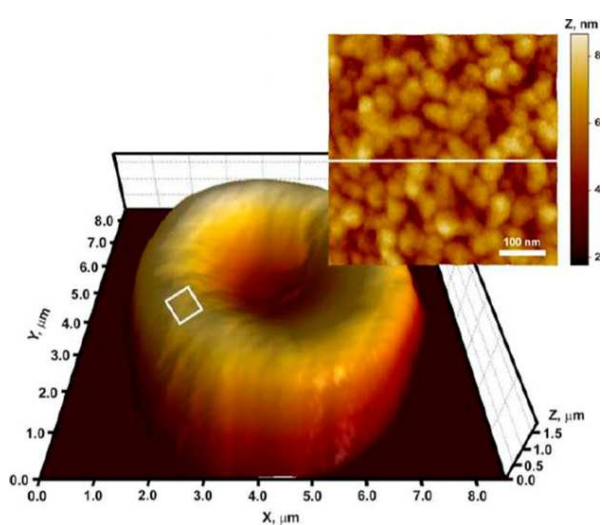


Рис. 15. АСМ-изображение эритроцита, демонстрирующее наноразмерные элементы его поверхности.

подходящей областью для прямого контакта эритроцитов с наноструктурами серебра (рис. 15).

Границы серебряных колец позволяют получить большее усиление КР-сигнала, по сравнению с отдельно расположенными кластерами серебра внутри колец (рис. 16). В случае, если эритроцит располагается на стенке, высота которой обычно составляет 300 нм (рис. 17), он старается принять такое положение, чтобы «окутать» стенку, в связи с чем форма мембраны эритроцита подстраивается под форму стенки (рис. 12).

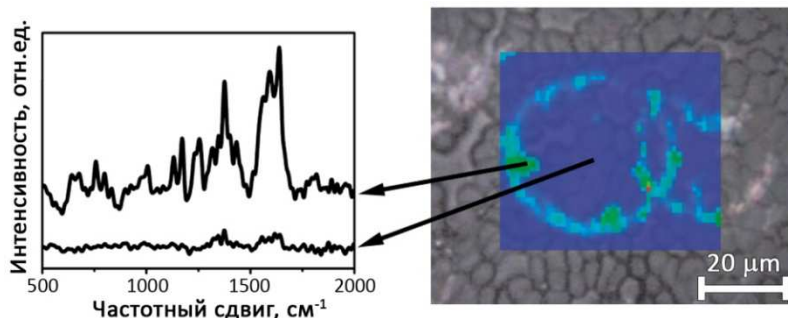


Рис. 16. Результаты ГР-картирования высушенного слоя эритроцитов на наноструктурированной подложке и типичные ГР-спектры с различных областей: на стенке кольца и на плоской поверхности.

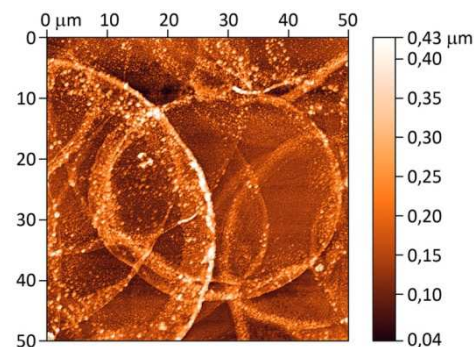


Рис. 17. АСМ-изображение наноструктурированного покрытия на основе серебра (температура осаждения – 270 °С, время – 40 мин).

Полученные результаты являются первыми в области ГР-исследования живых клеток на наноструктурированной поверхности. Наноструктурированные покрытия на основе металлического серебра подобного типа позволяют преодолеть все еще существующие проблемы, связанные с получением высокочувствительных и воспроизводимых ГР-подложек. Исследование Гб_{мс} в составе живых эритроцитов является важным для биомедицинской диагностики, т.к. конформация и состояние Гб_{мс} изменяются при сердечно-сосудистых заболеваниях, гемоглинопатиях, талассемии и диабете. В связи с этим, можно предположить, что поверхности, состоящие из серебряных колец, перспективны для биомедицинского анализа живых клеточных культур, одиночных клеток и других объектов.

Выводы

1. Впервые разработан метод получения НЧС от 2 до 100 нм и наноструктурированных покрытий на основе серебра путем разложения аммиачного комплекса гидроксида серебра (I) в водном растворе (при температурах 25 – 90 °С) и в виде аэрозоля (200 – 900 °С). Показано, что при аэрозольном осаждении серебра на нагретые выше 60 °С подложки процесс протекает через образование Ag₂O и приводит к формированию иерархически организованных кольцеобразных структур с полосой ППР в области 390 – 410 нм. Установлено, что созданные наноструктурированные покрытия не вызывают гемолиза эритроцитов и позволяют осуществлять их неинвазивную трансмембранную диагностику методом ГР.
2. Впервые систематически изучено влияние морфологии, размера НЧС (средний размер частиц в виде сфер – 2 – 90 нм, пластинок – 10 – 50 нм x 5 – 15 нм, нитей –

50 – 100 нм x 30 – 50 мкм, кубов – 100 нм – 3 мкм), состояния их поверхности на оптические свойства и ГР-активность при анализе живых эритроцитов. Установлено, что, в зависимости от предыстории получения, положение полосы ППР может контролируемо варьироваться в диапазоне 380 – 690 нм. Однако использование полученных НЧ для ГР-диагностики возможно лишь при отсутствии на их поверхности посторонних органических молекул и минимизации взаимного влияния НЧ, живых клеток и компонентов культуральной среды.

3. Исследовано влияние температуры синтеза (25 – 60 °С) и времени старения золь (1 – 60 дней) НЧС сферической формы на их функциональные свойства. Показано, что частицы, полученные при комнатной температуре, стабильны в течение нескольких месяцев и в наибольшей степени усиливают ГР-сигнал гемоглобина.
4. Исследовано влияние компонентов физиологических буферов на стабильность НЧС анизотропной формы. Обнаружено значительное смещение полосы ППР (на 100 – 300 нм) за течение 1 – 5 мин в присутствии хлорид-ионов, входящих в состав стандартных буферных растворов, что коррелирует с повышением изотропности частиц в процессе их спонтанной рекристаллизации. В связи с этим, предложено использование нитратного буфера для анализа биологических объектов методом ГР с использованием НЧС анизотропной формы.
5. Обнаружены систематические корреляции между параметрами кривых распределения НЧ, спектрами поглощения и коэффициентом усиления сигнала ГР. Предложена модель, объясняющая эффективность трансмембранной диагностики живых эритроцитов с использованием наноструктурированных материалов на основе серебра и предполагающая, что необходим прямой контакт наноструктур и живых клеток для реализации эффекта усиления ГР-сигнала до 10^4 раз за счет локального электромагнитного поля.

Список цитируемой литературы

1. Kneipp J., Wittig B., Bohr H., Kneipp K. Surface-enhanced Raman scattering: a new optical probe in molecular biophysics and biomedicine // *Theoretical Chemistry Accounts*. 2009. Vol. 125(3/6). P. 319-327.
2. Bantz K.C., Meyer A.F., Wittenberg N.J., Im H., Kurtuluş Ö., Lee S.H., Lindquist N.C., Oh S.-H., Haynes C.L. Recent progress in SERS biosensing // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2011. Vol. 13(24). P. 11551-11567.
3. Vitol E.A., Orynbayeva Z., Friedman G., Gogotsi Y. Nanoprobes for intracellular and single cell surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) // *Journal of Raman Spectroscopy*. 2012. Vol. 43(7). P. 817-827.
4. Rycenga M., Cobley C.M., Zeng J., Li W., Moran C.H., Zhang Q., Qin D., Xia Y. Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications // *Chemical Reviews*. 2011. Vol. 111(6). P. 3669-3712.
5. Крутяков Ю.А., Кудринский А.А., Оленин А.Ю., Лисичкин Г.В. Синтез и свойства наночастиц серебра: достижения и перспективы // *Успехи химии*. 2008. Т. 77. № 3. С. 242-269.
6. Leopold N., Lendl B. A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride // *Journal of Physical Chemistry B*. 2003. Vol. 107(24). P. 5723-5727.
7. Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R., Luneva O.G., Bryzgalova N.Y., Parshina E.Y., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V. New insight into erythrocyte through *in vivo* surface-enhanced Raman spectroscopy // *Biophysical Journal*. 2009. Vol. 97(12). P. 3206-3214.

8. Yunker P.J., Still T., Lohr M.A., Yodh A.G. Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions // *Nature*. 2011. Vol. 476(7360). P. 308-311.

Основное содержание диссертации изложено в работах:

1. *Semenova A.A., Goodilin E.A., Brazhe N.A., Eremina E.A., Maksimov G.V., Tretyakov Yu.D.* Silica microsphere decoration with silver nanoparticles by an impregnation and reduction technique // *Mendeleev Communications*. 2011. Vol. 21(2). P. 77–79.
2. *Семенова А.А., Е.А. Гудилин, Семенова И.А., Семенов А.П., Иванов В.К., Третьяков Ю.Д.* Наноструктурированные композитные пленки диоксид кремния – серебро с эффектом плазмонного резонанса // Доклады Академии Наук, серия «Химия». 2011. Т. 438. № 4. С. 490–493.
3. *Семенова А.А., Хабатова В.В., Браже Н.А., Браже А.Р., Максимов Г.В., Гудилин Е.А., Третьяков Ю.Д.* О применении наночастиц серебра, полученных с использованием «зеленой химии», в диагностике объектов биологической природы методом гигантского комбинационного рассеяния // Доклады Академии Наук, серия «Химия». 2011. Т. 440. № 6. С. 773–777.
4. *Semenova A.A., Goodilin E.A., Tretyakov Yu.D.* Direct preparation of anion-free pure silver hydrosols // *Mendeleev Communications*. 2011. Vol. 21(6). P. 312–314.
5. *Semenova A.A., Goodilin E.A., Brazhe N.A., Ivanov V.K., Barantchikov A.E., Goldt A.E., Sosnovtseva O.V., Savilov S.V., Egorov A.V., Brazhe A.R., Parshina E.Y., Luneva O.G., Maksimov G.V., Tretyakov Yu.D.* Planar SERS nanostructures with stochastic silver ring morphology for biosensor chips // *Journal of Materials Chemistry*. 2012. Vol.22(45). P. 23411–23427. DOI: 10.1039/C2JM34686A
6. *Семенова А.А., Гудилин Е.А., Семенов А.П., Третьяков Ю.Д.* Наноструктурированные подложки для трансмембранной диагностики клеточных структур методом поверхностно-усиленной спектроскопии комбинационного рассеяния // Тезисы II Международной научной конференции «Наноструктурные материалы – 2010: Беларусь–Россия–Украина» (НАНО-2010). Киев, Украина. 19–22 октября 2010. С. 716.
7. *Семенова А.А., Гудилин Е.А., Семенов А.П., Третьяков Ю.Д.* Наноструктурированные подложки для исследования биологических молекул методом гигантского комбинационного рассеяния // Сборник материалов IV Всероссийской конференции по наноматериалам. Москва, Россия. 01–04 марта 2011. С. 512.
8. *Semenova A.A., Khabatova V.V., Goodilin E.A., Brazhe N.A., Maksimov G.V., Tretyakov Yu.D.* «Green» vs inorganic chemistry: toward SERS diagnostics of intact red blood cells in personal medical care // E-MRS 2011 Spring Meeting & Bilateral Energy Conference. Nice, France. 9–13 May 2011. P-5.
9. *Хабатова В.В., Браже Н.А., Браже А.Р., Семенова А.А., Паршина Е.Ю., Гудилин Е.А., Сосновцева О.В., Максимов Г.В.* Исследование мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах с помощью спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния с наночастицами серебра // Сборник тезисов пятой международной конференции «Современные достижения бионаноскопии». Москва, Россия. 15–17 июня 2011. С. 60–61.
10. *Khabatova V.V., Brazhe N.A., Brazhe A.R., Semenova A.A., Parshina E.Y., Goodilin E.A., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V.* Surface enhanced Raman spectroscopy for in vivo studies of erythrocytes // *European Biophysics Journal*. 2011. Vol. 40. Suppl. 1. P. S218. (8th EBSA European Biophysics Congress. Budapest, Hungary. 23–27 august 2011).
11. *Semenova A.A., Khabatova V.V., Goodilin E.A., Brazhe N.A., Maksimov G.V., Tretyakov Y.D.* Silver sol preparation history and effectiveness of SERS diagnostics of intact red blood cells // *European Biophysics Journal*. 2011. Vol. 40. Suppl. 1. P. S 231–232 (8th EBSA European Biophysics Congress. Budapest, Hungary. 23–27 august 2011).
12. *Semenova A.A., Goodilin E.A., Khabatova V.V., Brazhe N.A., Maksimov G.V., Tretyakov Yu.D.* Silver nanoparticles for SERS of biomolecules // 2nd International school «Nanomaterials and nanotechnologies in living systems. Safety and nanomedicine». Hotel «Zarya», Moscow region, Russia. 19–24 september 2011. P. 192.
13. *Семенова А.А., Гудилин Е.А., Семенов А.П., Третьяков Ю.Д.* Наноструктурированные подложки для диагностики клеточных структур методом ГКР // Тезисы докладов XIX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии: В 4-х томах. Волгоград, Россия. 25–30 сентября 2011. Т. 2. С. 100–101.

14. *Semenova A.A., Goodilin E.A., Khabatova V.V., Brazhe N.A., Maksimov G.V., Tretyakov Yu.D.* Silver nanoparticles for SERS study of red blood cells // Abstracts of the Nanotechnology international forum "Rusnanotech 2011" participants and international competition of scientific papers in nanotechnology for young researchers Moscow, Russia. 26–28 october 2011. Nanobiotechnology, #17.
15. *Khabatova V.V., Brazhe N.A., Brazhe A.R., Semenova A.A., Parshina E.Y., Goodilin E.A., Sosnovtseva O.V., Maksimov G.V.* Surface enhanced Raman spectroscopy for in vivo studies of erythrocytes // 17th International Biophysics Congress. Beijing, China. 30 october – 3 november 2011. P. 491.
16. *Семенова А.А., Гудилин Е.А., Браже Н.А., Максимов Г.В., Третьяков Ю.Д.* Анализ процессов рекристаллизации наночастиц серебра и их применение в спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Байкальский материаловедческий форум»: В 2-х частях. Улан-Удэ, Россия. 9–13 июля 2012. Ч. 2. С. 134–136.
17. *Semenova A., Goodilin E., Brazhe N., Barantchikov A., Ivanov V., Maksimov G., Tretyakov Yu.* Single cell biomedical diagnostics using nanostructured silver substrates // International Conference of Young Researchers on Advanced Materials (ICYRAM 2012). Singapore. 1–6 july 2012. BH2-W-P15.
18. *Гудилин Е.А., Семенова А.А., Браже Н.А., Третьяков Ю.Д.* Биомедицинская диагностика на планарных наноструктурах // Доклады международной молодежной конференции «Тенденции развития планарных нанотехнологий на основе современного полиграфического оборудования» (PrintNanotech 2012). Москва, Россия. 11–13 сентября 2012. С. 5–11.
19. *Semenova A.A., Brazhe N.A., Maksimov G.V., Goodilin E.A.* Nanochemistry for noninvasive analysis of biological objects // Materials of International conference «Advances and Perspective Development of Biotechnology». Saransk, Russia. 3–5 october 2012. P. 102.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность и признательность академику Ю.Д. Третьякову за проявленный интерес, внимание к работе и ценные обсуждения результатов.

Автор искренне признателен Н.А. Браже, Е.Ю. Паршиной (биологический факультет МГУ) за помощь в проведении исследований эритроцитов методом ГКР и плодотворное обсуждение результатов; В.К. Иванову, А.Е. Баранчикову (Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова) за исследование образцов методом РЭМ, интерес к работе и ценные дискуссии.

Благодарность за помощь и исследование образцов методом АСМ автор выражает В.А. Лебедеву (ФНМ МГУ); методом ПЭМВР – С.В. Савилову, А.В. Егорову (химический факультет МГУ); методом РЭМ – М.А. Шехиреву, Д.М. Иткису (ФНМ МГУ); методом ПЭМ – С.С. Абрамчуку (физический факультет МГУ); методом ГКР – А.А. Елисееву (ФНМ МГУ); методом РФА – Т.В. Филипповой, А.В. Гаршеву (ФНМ МГУ); методом ДТА – Т.Б. Шаталовой (химический факультет МГУ); методом ИК-спектроскопии – И.В. Колесник (ФНМ МГУ); методом капиллярной конденсации азота – А.С. Вячеславу (ФНМ МГУ). За проведение ряда экспериментов автор благодарит студентов В.В. Хабатову (биологический факультет МГУ) и Р.Г. Сеидову (ФНМ МГУ). За ценные указания и обсуждение результатов автор благодарит О.А. Шляхтина, А.М. Гаськова, М.Н. Румянцеву, Е.А. Еремину (химический факультет МГУ).

Автор благодарит весь коллектив лаборатории неорганического материаловедения кафедры неорганической химии химического факультета, кафедры наноматериалов факультета наук о материалах и кафедры биофизики биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Особую благодарность автор выражает родителям, сестре и близким друзьям.