

при 25 °С - за 90 мин, а при 4 °С - более 90 мин. При этом отношение фонового сигнала (в отсутствие определяемой ДНК) к специфическому не зависело от времени, температуры инкубации и от используемого объема гибридного белка His₆-SA-Luc (50-150 мкл).

В оптимизированных условиях (10 пкмоль зонда/лунка, объем зонда 30 мкл, 3 нМ Luc-SA, объем Luc-SA 100 мкл, инкубация при 37 °С, 1 час) мы получили калибровочную кривую зависимости биолюминесцентного сигнала от концентрации ДНК. Предел обнаружения составил 10⁻¹⁰ М ДНК, что эквивалентно 0.4 нг ДНК/лунку

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гибридный белок Luc-SA является эффективным реагентом для специфической детекции клеток микроорганизмов как с использованием иммуноанализа, так и в системах на основе детекции ДНК. Следовательно, His₆-SA-Luc может быть использован в качестве универсального реагента для разработки новых высокочувствительных систем на основе биотин-стрептавидиновых взаимодействий.

Список литературы / References:

1. Koksharov M.I., Ugarova N.N. Approaches to engineer stability of beetle luciferases. *Computational and structural biotechnology journal*, 2012, vol. 2, pp. 1-7.
2. Smirnova D.V., Koksharov M.I., Zorov I.N., Ugarova N.N. Luciferase-streptavidin fusion proteins: Preparation and properties. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2014, vol. 69, pp. 56-61.
3. Koksharov M.I., Ugarova N.N. Thermostabilization of firefly luciferase by in vivo directed evolution. *Protein Eng. Des. Sel*, 2011, vol. 24, pp. 835-844.
4. Koksharov M.I., Ugarova N.N. Triple substitution G216N/A217L/S398M leads to the active and thermostable *Luciola mingrelicafirefly* luciferase. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, vol. 10, pp. 931-938.
5. Quiñones B., Swimley M.S., Narm K.-E., Patel R.N., Cooley M.B., Mandrell R.E. O-antigen and virulence profiling of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a rapid and cost-effective DNA microarray colorimetric method. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2012, vol. 2, pp.1-10.
6. Koksharov M.I., Smirnova D.V., Abbasova S.G., Ugarova N.N. A fusion protein of *Luciola mingrelica* luciferase with a biotin-binding domain: Production, properties, and application. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2011, vol. 66, pp. 241-246.
7. Smith D.K., Kassam T., Singh B., Elliott J.F. *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J. Bacteriol.*, 1992, vol. 174, pp. 5820-5826.
8. Li W., Li J. *High speed quantitative analysis of DNA methylation, by immobilization of DNA on the plastic carrier coated with polylysine, then incubating at a two-phase temperature and immunodetection of 5-methylcytosine structures as markers of DNA methylation*, 2010, US 778579382.
9. Lomakina G.Y., Istrate A., Rudenko N.V., Ugarova N.N. Synthesis and application of firefly luciferase antibody conjugates in a bioluminescent immunoassay of *Salmonella* cells. *Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2014, vol. 69, pp. 49-55.

НАНОЧАСТИЦЫ СЕРЕБРА В КАРБОКСИМЕТИЛХИТИНЕ В ПРИСУТСТВИИ ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ И МЕТИЛГАЛЛАТА ДЛЯ БИМЕДИЦИНЫ: ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МОРФОЛОГИЯ

Широкова Л.Н.¹, Дубинчук В.Т.²

¹ Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН

Ленинский просп., 29, г. Москва, 119991 ГСП-1, РФ

e-mail: shirokova@ips.ac.ru

² Всероссийский научно-исследовательский институт минерального сырья им. Н.М. Федоровского

Старомонетный пер., 31, г. Москва, 119017, РФ

Аннотация. Разработан одностадийный процесс перевода наночастиц серебра из их мицеллярного раствора в изооктане в водный раствор карбоксиметилхитина в присутствии антиоксидантов посредством ультразвукового облучения, исключая промежуточную стадию получения водной дисперсии наночастиц серебра. В макромолекулярной системе на основе карбоксиметилхитина и наночастиц серебра в присутствии антиоксидантов галловой кислоты и метилгаллата было отмечено усиление эффекта стабилизации наночастиц серебра. Показано, что стабилизация наночастиц серебра в системе карбоксиметилхитин–наночастицы серебра в присутствии метилгаллата осуществлялась наиболее эффективно, что обусловлено различной природой заместителей в карбоксильной группе антиоксиданта.

Ключевые слова: наночастицы серебра, карбоксиметилхитин, галловая кислота, метилгаллат, ультразвук.

SILVER NANOPARTICLES IN CARBOXYMETHYL CHITIN IN THE PRESENCE OF GALLIC ACID AND METHYL GALLATE FOR BIOMEDICINE: OPTICAL PROPERTIES AND MORPHOLOGY

Shirokova L.N.¹, Dubinchuk V.T.²

¹ Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences,
Leninskii pr., 29, Moscow, 119991, Russia
e-mail: shirokova@ips.ac.ru

² Fedorovskii All-Russian Research Institute of Mineral Resources
Staromonetyi per., 31, Moscow, 119017, Russia

Abstract. Developed a one-step process to transfer silver nanoparticles of their micellar solution in isoctane to the aqueous solution of carboxymethyl chitin in the presence of antioxidants by ultrasonic irradiation, excluding an intermediate stage of producing dispersion of silver nanoparticles in water. In the macromolecular system based on carboxymethyl chitin and silver nanoparticles in the presence of antioxidants gallic acid and methyl gallate enhancement effect of silver nanoparticles stabilization has been marked. It is shown that stabilization of silver nanoparticles in carboxymethyl chitin–silver nanoparticles system in the presence of methyl gallate has been carried out most efficiently, due to various nature of substituents at carboxyl group of an antioxidant.

Key words: silver nanoparticles, carboxymethyl chitin, gallic acid, methyl gallate, ultrasound.

Среди методов получения наночастиц металлов особый интерес представляет синтез наноразмерных частиц металлов в обращенных мицеллах, стабилизированных ПАВ в органическом растворителе. Важное преимущество метода обращенных мицелл состоит в возможности получения высокодисперсных наночастиц металлов, размер которых равен нескольким нанометрам. Когда наночастицы металлов, в частности серебра в обращенных мицеллах используют для создания нанокомпозитных материалов для биомедицины (пленок, волокон и т.д.), возникает необходимость совмещать наночастицы с водным раствором полимера. В качестве такого высокомолекулярного соединения было предложено водорастворимое производное хитина 6-О-карбоксиметилхитин (далее карбоксиметилхитин), которое является нетоксичным, биоразлагаемым, совместимым с большинством биологических систем полимером. Для обеспечения процесса совмещения наночастиц с водным раствором полимера требуется предварительно получить водную дисперсию наночастиц металлов из их мицеллярного раствора в углеводороде. Однако данный процесс сопровождается длительной выдержкой гетерофазной системы до тех пор, пока не будет достигнуто четкого разделения органического и водного слоев. Кроме того, указанный процесс связан с потерей частиц вследствие их окисления и дестабилизации.

Учитывая сказанное, целью настоящей работы являлась разработка одностадийного процесса для перевода наночастиц серебра из их мицеллярного раствора в изооктане в водный раствор карбоксиметилхитина, исключая промежуточную стадию получения водной дисперсии наночастиц серебра. Для достижения этой цели использовали ультразвуковую обработку гетерофазной системы изооктан-вода, содержащей наночастицы серебра и полимер карбоксиметилхитин соответственно. Процесс осуществляли на воздухе не применяя инертные газы. Для защиты наночастиц серебра от окисления кислородом, растворенным в воде, в водный раствор полимера вводили следующие антиоксиданты растительного происхождения: галловая кислота – 3,4,5-триоксибензойной кислоты и ее производное - метиловый эфир галловой кислоты (метилгаллат) – метил 3,4,5-триоксибензоат (см. рис. 1).

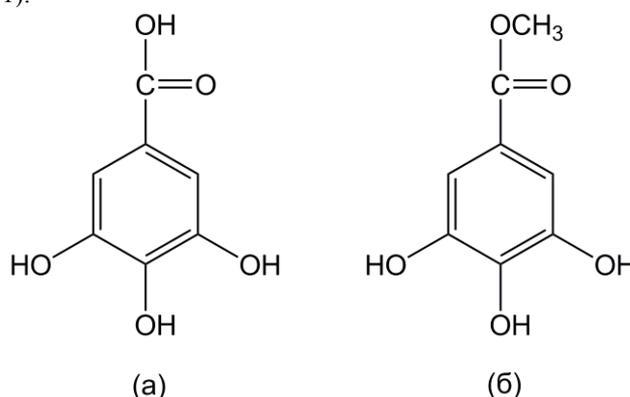


Рисунок 1 – Структурные формулы галловой кислоты (а) и метилгаллата (б)

Природные фенольные антиоксиданты, содержащие одну или более гидроксильных групп в своей структуре, привлекают внимание исследователей благодаря их антиоксидантной активности и снижению риска сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [1].

Материалы и методы. В работе использовали хитин ((1 → 4)-2-ацетиамидо-2-деокси-β-D-глюкан), получаемый из панцирей и клешней краба с $M = (40-45) \times 10^4$ (“Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии”, Россия). Гидроксид натрия (х.ч.), изопропанол-2 (о.с.ч.), монохлоруксусную кислоту (х.ч.), 3,4,5-триоксибензойная кислота (“Acros Organics”), метил

3,4,5-триоксибензоат (“Acros Organics”) применяли без предварительной очистки. Водные растворы реагентов готовили с использованием дистиллированной воды pH 5.6-6.0. Мицеллярный раствор наночастиц серебра в изооктане (“Ланакон”, Россия) использовали в качестве источника наночастиц [2]. Наноразмерные частицы серебра получали радиационно-химическим восстановлением ионов серебра Ag^+ активными восстановительными частицами радиолиза (сольватированными электронами, атомарным водородом или другими радикалами), генерируемыми γ -излучением ^{60}Co в обратно-мицеллярной системе $AgNO_3-H_2O-1,4$ -бис-[(2-этилгексил)окси]-1,4-диоксобутан-2-сульфонат натрия (Аэрозоль-ОТ или АОТ)–изооктан. Для предотвращения агрегации наночастиц в систему вводили АОТ в количестве 0.15 моль/л. Для получения водно-органического мицеллярного раствора использовали серебро азотнокислородное (ч.д.а.), АОТ (“Acros Organics”), изооктан (ч.д.а.). Доза облучения составляла 10 кГр, степень гидратации $\omega = [H_2O]/[AOT] = 8.0$. Водорастворимое производное хитина - карбоксиметилхитин в солевой натриевой форме со среднемолекулярной $M = 8 \times 10^4$ и степенью карбоксиметилирования 1.0 был синтезирован из хитина по известной методике (см. рис. 2). Значение молекулярной массы карбоксиметилхитина определяли с использованием метода ультрацентрифугирования.

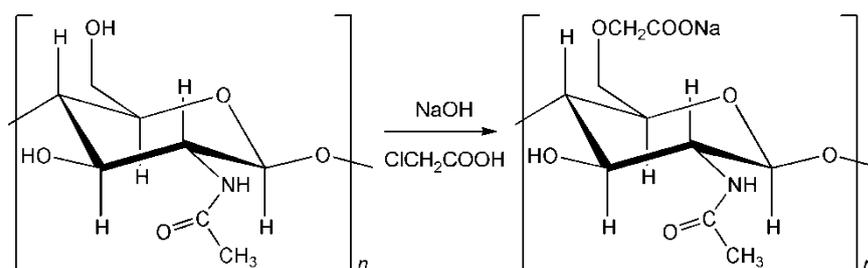


Рисунок 2 – Синтез карбоксиметилхитина

Для получения гетерофазной системы изооктан–вода использовали 0.5 мас. % раствор карбоксиметилхитина в воде, в который вводили антиоксиданты (0.5 и 1.0 мас. % по полимеру). После этого необходимое количество мицеллярного раствора наночастиц серебра в изооктане добавляли к водному раствору карбоксиметилхитина порциями (без перемешивания) с учетом величины оптической плотности наночастиц серебра. Ультразвуковую обработку полученных гетерофазных систем проводили в две стадии длительностью 5 мин каждая с использованием установки УЗО-СТ (“Рэлтек”, Россия) с частотой 44 кГц. Во избежание роста температуры исследуемых растворов выше 20 °С под действием ультразвука их охлаждали льдом.

Количественное определение содержания наночастиц серебра, а также оценку их устойчивости в системах с карбоксиметилхитином, проводили путем измерения оптической плотности наночастиц серебра при длине волны 420 нм с использованием УФ-Вид-спектрометра SPECORD M40 (“Carl Zeiss”, Германия) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 мм при 24 °С. Размер и форму наночастиц металла исследовали с использованием метода ПЭМ на просвечивающем электронном микроскопе Теснаи (“FEI”, США).

Результаты и их обсуждение. Перевод наночастиц серебра из их мицеллярного раствора в изооктане в водный раствор карбоксиметилхитина осуществляли, используя ультразвуковую обработку гетерофазной системы изооктан–вода, содержащей наночастицы серебра и карбоксиметилхитин с антиоксидантом соответственно. Отметим, что эффективность перевода наночастиц серебра из мицеллярного раствора в водный раствор карбоксиметилхитина без использования антиоксиданта была заметно ниже. Чтобы выявить оптимальное соотношение полимер-антиоксидант, брали две концентрации антиоксиданта 0.5 и 1.0 мас. % (от массы полимера), что соответствует концентрации антиоксидантов, обычно применяемых для защиты субстратов от окисления. Антиоксидантная активность таких соединений связана с присутствием в их структуре гидроксильных групп, а также конформацией их молекул.

Как видно из представленных данных (см. рис. 3в), наибольшая величина оптической плотности при 400-420 нм, а, следовательно, и максимальная концентрация наночастиц серебра была достигнута при концентрации метилгаллата 1.0 мас. % во время выдержки системы 1 сутки. Таким образом, присутствие метилгаллата в системе обеспечивает наиболее полный перевод наночастиц серебра из их мицеллярного раствора в изооктане в водный раствор карбоксиметилхитина. Рост величины оптической плотности и доли наночастиц серебра, переведенных в водный раствор карбоксиметилхитина, наблюдали также для системы, содержащей галловую кислоту, но эффективность процесса транспорта наночастиц в присутствии указанного антиоксиданта была снижена в последующее время наблюдения (см. рис. 3б).

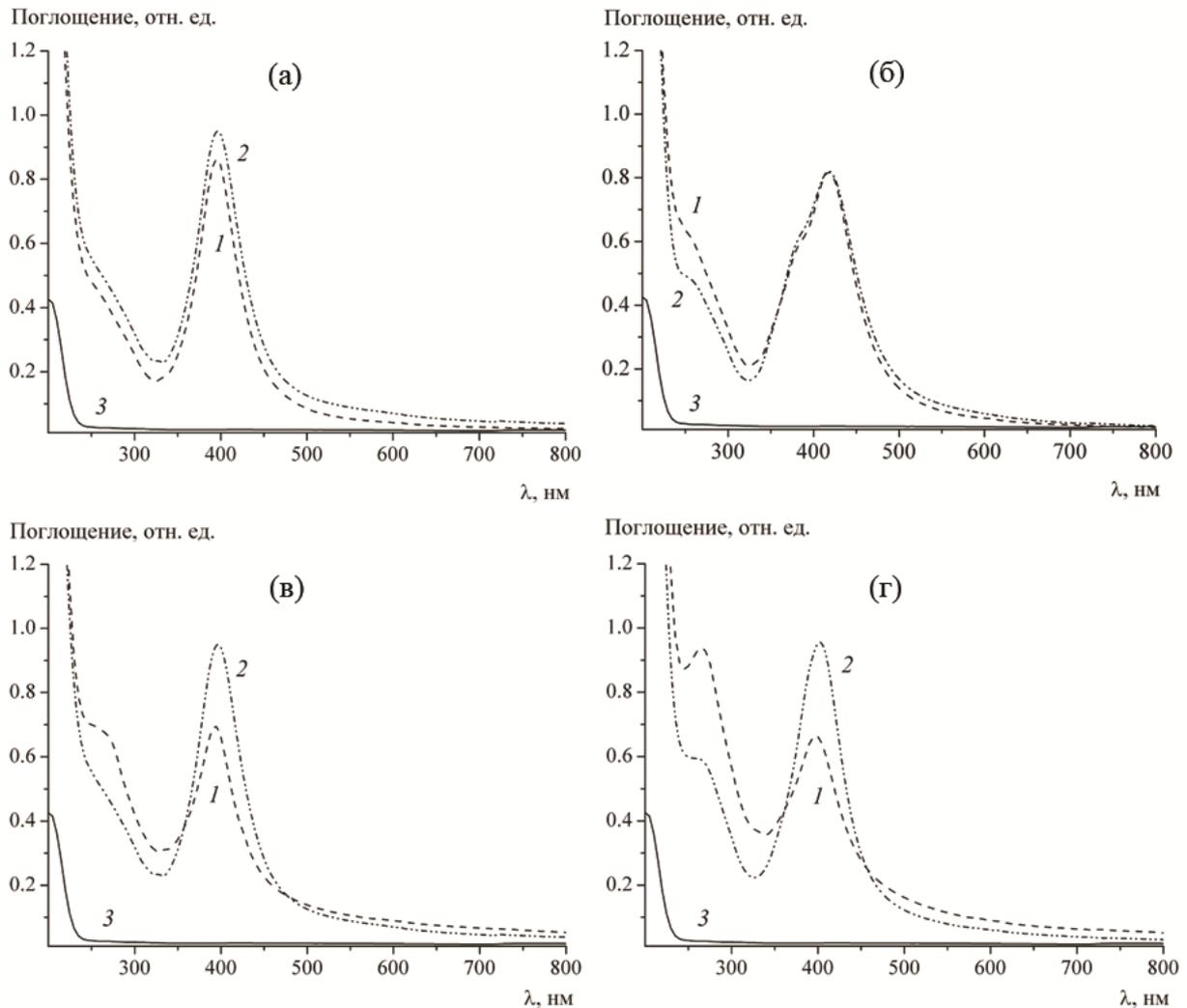


Рисунок 3 – Электронные спектры 0.5 мас. % карбоксиметилхитин–наночастицы серебра–антиоксидант (а, б – галловая кислота, в, г – метилгаллат). Концентрация антиоксиданта 0.5 (а, в) и 1.0 мас. % по полимеру (б, г); 1, 2 – время выдержки системы 1 и 14 суток соответственно, 3 – 0.5 мас. % карбоксиметилхитин в воде. Время ультразвуковой обработки 10 мин.

В предыдущих исследованиях было показано, что спектральные проявления поляризации связи $-\text{NH}$ в ацетамидной группе карбоксиметилхитина и связи $-\text{C}=\text{O}$ в сложноэфирной группе АОТ могут быть отнесены к образованию водородных связей в системе карбоксиметилхитин–АОТ [3, 4]. При этом полимер в такой системе служит не только материалом для получения композитов, но и выполняет функции стабилизатора наночастиц металла, а также модификатора, изменяющего средство поверхности гидрофобной наночастицы металла к молекулам воды.

Показано, что в присутствии растительных антиоксидантов возможно образование водородных связей между стабилизирующей оболочкой мицеллы, антиоксидантом и полимерной матрицей. Такое взаимодействие может приводить к дополнительной стабилизации наночастиц серебра в макромолекулярной системе карбоксиметилхитин-наночастицы серебра-антиоксидант [5]. Кроме того, поскольку присутствие метильного заместителя $-\text{CH}_3$ в группе $-\text{COOCH}_3$ проявляет выраженный электронодонорный характер, то наличие такого заместителя в метилгаллате способствует усилению плотности заряда на карбониле, который, как известно, участвует в стабилизации наночастиц металлов в различных макромолекулярных системах. Таким образом, стабилизирующее влияние карбоксиметилхитина и антиоксиданта по отношению к наночастицам серебра может быть обусловлено не только эффектом стерической изоляции частиц макромолекулами, образованием системы водородных связей между наружной оболочкой наночастиц, антиоксидантом и макромолекулой, но также природой функциональной группы антиоксиданта.

Согласно результатам ПЭМ была отмечена в основном сферическая форма наночастиц серебра в системе карбоксиметилхитин–наночастицы серебра в присутствии галловой кислоты (см. рис. 4а), среднее значение диаметра металлических наночастиц составило 5.3 нм (см. рис. 4б). В свою очередь, среднее значение диаметра металлических наночастиц в системе карбоксиметилхитин-наночастицы серебра в присутствии метилгаллата составило порядка 4 нм. Данные ПЭМ согласуются с результатами, полученными с использованием метода

UV-Vis спектроскопии. На микродифрактограмме присутствуют данные, соответствующие кристаллической решетке серебра.

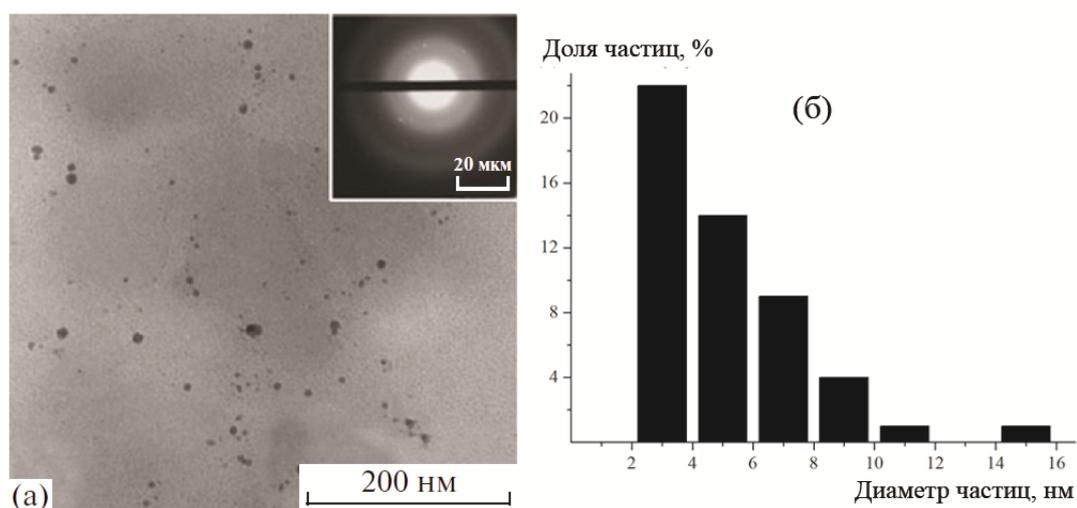


Рисунок 4 – Электронная микрофотография, соответствующая ей дифракционная картина пленок из водных растворов систем карбоксиметилхитин–наночастицы серебра–галловая кислота (а) и гистограмма распределения частиц по размерам (б). Соотношение водный раствор карбоксиметилхитин: мицеллярный раствор наночастиц серебра 1:1 (по объему), концентрация карбоксиметилхитина 0.5 мас. %, концентрация антиоксиданта 0.5 мас. % по полимеру

Заключение. В присутствии антиоксидантов в системе карбоксиметилхитин–наночастицы серебра, образовавшейся после санирования, растет величина характерной полосы поглощения наночастиц серебра при длине волны λ_{\max} 400–420 нм, в то время как в отсутствие антиоксидантов наблюдалось некоторое снижение величины полосы поглощения наночастиц серебра во времени. Причем, в системе карбоксиметилхитин–наночастицы серебра–метилгаллат по сравнению с системой карбоксиметилхитин–наночастицы серебра–галловая кислота отмечалось значительное усиление эффекта стабилизации наночастиц серебра, что обусловлено различной природой заместителей в карбоксильной группе антиоксидантов.

Список литературы / References:

- Mittal A.K., Kumar S., Banerjee U.C. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. *J. Colloid Interface Sci.*, 2014, vol. 431, pp. 194-199.
- Kuz'min V.I., Gadzaov A.F., Tytik D.L., Busev S.A., Revina A.A. Formation kinetics of silver nanoparticles in reverse micelles. 3. Reductant concentration and temperature as factors controlling synthesis of nanoparticles. *Colloid J.*, 2015, vol. 77, no. 6, pp. 733-744.
- Shirokova L.N., Alexandrova V.A., Revina A.A. The structure and composition of iron nanoparticles stabilized by carboxymethyl chitin resulting from ultrasonic irradiation. *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.*, 2016, vol. 52, no. 1, pp. 66-73.
- Alexandrova V.A., Shirokova L.N., Revina A.A. Carboxymethyl chitin as a matrix for composites with iron nanoparticles. *Polym. Sci. B*, 2010, vol. 52, no. 9-10, pp. 621-627.
- Alexandrova V.A., Shirokova L.N., Bondarenko G.N., Petrosyan A.S. Silver-carboxymethyl chitin nanocomposites. *Polym. Sci. A*, 2013, vol. 55, no. 2, pp. 107-114.