

ПОДХОД К ПОЛУЧЕНИЮ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

© Е. А. Горбунова*, А. В. Епанчинцева, И. А. Пышная

Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук
Россия, 630090 г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8.

*Email: gorbunova-ekaterina@inbox.ru

*Наночастицы золота (НЧЗ), содержащие флуоресцентные метки, высоко востребованы для развития диагностики заболеваний, в т.ч. онкологических. Нами описан способ ковалентного присоединения флуоресцина к НЧЗ диаметром 12.7 (НЧЗ-13) и 6.1 нм (НЧЗ-6) через линкер –ПЭГ₇₁-NH-(CH₂)₆-NH–, позволяющий разнести в пространстве НЧЗ и флуорофор на расстояние, необходимое для преодоления эффекта тушения флуоресценции поверхностью НЧЗ. Полученные флуоресцирующие конъюгаты НЧЗ могут эффективно применяться для биовизуализации опухолевых тканей *in vivo*.*

Ключевые слова: наночастицы золота, флуоресценция, биовизуализация, полиэтиленгликоль, флуоресцин.

Введение

Благодаря своим физико-химическим свойствам наночастицы золота (НЧЗ) являются основой для создания систем диагностики и доставки терапевтических средств (ТС), несущих сигнальную (флуоресцентную, радиоактивную и др.) метку [1–3], в т.ч. нуклеиновых кислот [4]. Для оценки биораспределения [5–7], поглощения [8] и цитотоксичности [9–11] с участием НЧЗ, как правило, применяют метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой [8; 12–14] и метод проточной цитометрии [15–16]; в последнем детектировать можно только флуоресцирующие НЧЗ. При этом хорошо известно, что НЧЗ являются эффективным тушителем флуоресценции [17]. Тушение преодолевают, используя расщепляемый линкер между НЧЗ и ТС [18–20] или разнося в пространстве на достаточное расстояние НЧЗ и ТС так, чтобы итоговые НЧЗ флуоресцировали [18; 21]. В частности, НЧЗ конъюгируют с тио-содержащим полиэтиленгликолем (SH-ПЭГ) различной длины. ПЭГ [22–23] увеличивает клеточное поглощение и продлевает время циркуляции НЧЗ, что делает его привлекательным линкером для создания флуоресцирующих НЧЗ [24]. Теоретический расчет позволяет оценить необходимую длину спейсера, затем требуется ее тонкая настройка экспериментальным путем. Флуоресцин широко применяется в молекулярной биологии, однако в литературе не описано способов преодоления тушения его флуоресценции при адсорбции на НЧЗ, наблюдающегося из-за того, что длина волны эмиссии флуоресцина ниже длины волны плазмонного резонанса НЧЗ [25]. Мы предлагаем подход для конъюгации флуоресцина и НЧЗ диаметром 6 и 13 нм, способных к эффективному проникновению в клетки, посредством линкера оптимизированного состава. В представленной работе описана модификация НЧЗ-С-ПЭГ-СООН гексаметилендиамином для дальнейшего присоединения флуорофора в форме сукциниimidного эфира. Физико-химические свойства конъюгатов НЧЗ были исследованы на каждом этапе в рамках разработки протокола синтеза валидированных флуоресцирующих препаратов для биомедицинского применения, а именно в клеточной визуализации.

Экспериментальная часть

1. Синтез НЧЗ

НЧЗ-13 получали методом цитратного восстановления HAuCl₄·H₂O в соответствии с [26]. НЧЗ-6 – методом «роста семян» согласно [27] с изменениями. В 10 мл водного раствора, содержащего 0.25 мМ HAuCl₄ («Аурат», Россия) и 0.25 мМ Na₃C₆H₅O₇ (Acros, США), добавляли 0.3 мл ледяного свежеприготовленного раствора 0.1 М NaBH₄ (Serva, США) при интенсивном перемешивании на льду. Через 3 ч к 2.5 мл полученного раствора добавляли последовательно 7.5 мл водного раствора, содержащего 0.25 мМ HAuCl₄ и 1% поливинилпирролидон (58000 Да, Acros organics, Бельгия), и 0.05 мл свежеприготовленного водного раствора 0.1 М C₆H₈O₆ (Honeywell Fluka, Германия) при 25 °C и перемешивании. После интенсивного перемешивания в течение 20 мин реакционную смесь центрифугировали 1 ч при 100 000 g («Beckman Coulter», США), убирали супернатант и доводили до нужной концентрации буферным раствором 10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА (Acros, США), pH 8,0.

2. Синтез НЧЗ-ПЭГ

НЧЗ (10 пмоль) инкубировали с водным раствором 29 мкМ HS-ПЭГ-СООН (3,2 кДа, Iris Biotech GmbH, Германия) при 25 °C и встряхивании 1 400 об./мин в течение 24 ч. Избыток HS-ПЭГ-СООН удаляли центрифугированием (I) для НЧЗ-ПЭГ-13 – 30 мин при 16 100 g, отмыvkой три раза 4 мМ Na₃C₆H₅O₇; (II) для НЧЗ-ПЭГ-6 – 1 ч

при 100 000 g, отмывкой раствором 10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0. До необходимой концентрации НЧЗ-ПЭГ-13 доводили 4 мМ $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, НЧЗ-ПЭГ-6 – раствором 10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0.

3. Синтез НЧЗ-NH₂

10 пмоль НЧЗ-ПЭГ, 1 мкмоль 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (ЕДК, Applichem, Германия) и 0,01 мкмоль гексаметилендиамина (Sigma-Aldrich, США) инкубировали в течение 24 ч в буферном растворе Трис-HCl pH 8,6 согласно [28]. Удаление избытка гексаметилендиамина проводили аналогично п. 2. Продукт реакции далее в тексте обозначен как НЧЗ-NH₂-13 или НЧЗ-NH₂-6.

4. Синтез НЧЗ-Flu

10 пмоль НЧЗ-NH₂ вводили в реакцию с 0,01 мкмоль флуоресцеин-5-изотиоционата (Sigma-Aldrich, США). Реакционную смесь общим объемом 1 мл инкубировали при 25 °C в течение 24 ч в растворе Tris-HCl pH 8,6, избыток флуоресцеина удаляли аналогично п. 2.

5. Определение емкости флуоресцеина на НЧЗ

По данным интенсивности флуоресценции конъюгатов НЧЗ-Flu и стандартных растворов флуоресцеина с концентрацией 1, 2, 4, 6, 8, 10 нМ рассчитывали концентрацию флуоресцеина на НЧЗ с использованием градуировочного графика. Спектрофотометрически определяли концентрацию конъюгатов НЧЗ-Flu и рассчитывали количество флуоресцеина на НЧЗ (q) по формуле (1): $q = \frac{[\text{Flu}]_{\text{конъюгат}}}{[\text{НЧЗ-Flu}]}$.

6. Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel на основе t-критерия Стьюдента с доверительной вероятностью 0,95. Значения ζ -потенциала, PdI, емкости флуоресцеина на НЧЗ указано как среднее значение \pm ошибка; значение гидродинамического диаметра указано как среднее значение \pm стандартное отклонение. Каждый эксперимент выполняли не менее чем в четырех повторах.

7. Определение доли целевых НЧЗ

Процентную долю целевых НЧЗ в реакционной смеси q определяли по формуле (2):
 $q = \frac{A_1}{A_0} \cdot 100\%$, где A_1 – оптическая плотность конечных целевых НЧЗ после выделения, A_0 – оптическая плотность исходной реакционной смеси НЧЗ до выделения.

8. Центрифугирование в вязкой среде

В пробирку с 800 мкл 84% раствора сахарозы поместили 200 мкл реакционной смеси, содержащей конъюгаты НЧЗ-6 с концентрацией 40 нМ, центрифугировали в течение 50 мин при 16 100 g, собирали фракцию очищенных конъюгатов НЧЗ-6.

9. Диализ

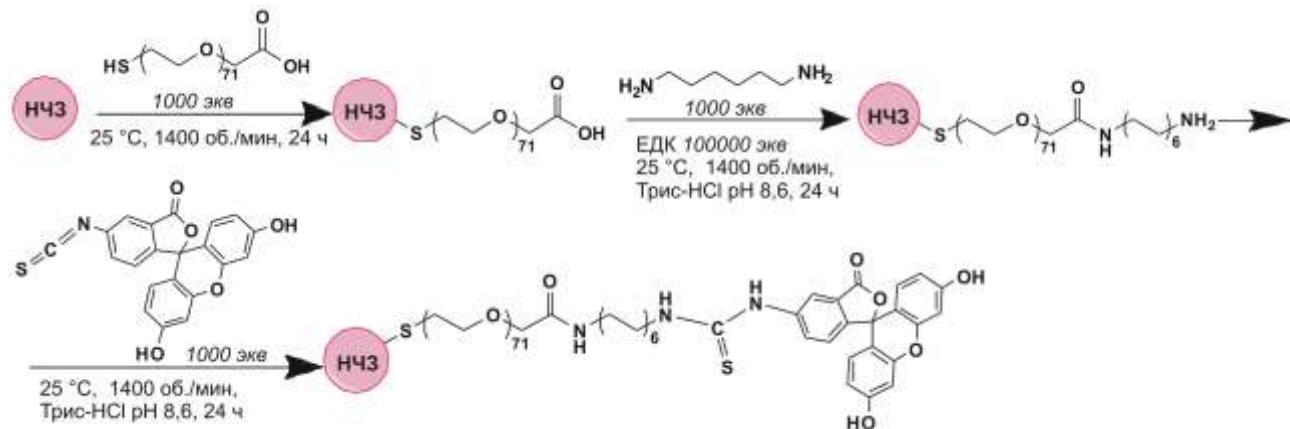
Диализ проводили в пробирках с винтовой крышкой объемом 1,5 мл с использованием мембранны для экспресс-тестера Whatman (Maidstone, UK) с диаметром пор 30 нм при 25 °C в течение 16 ч против 10 мМ Трис, 1 мМ ЭДТА (pH 8,0).

Результаты и обсуждение

1. Анализ исходных НЧЗ и их конъюгатов физико-химическими методами

ПЭГ, содержащие SH-группу с одного конца и карбоксильную или амино-группы с другого конца [29–31], активно используются как бифункциональные линкеры для образования связей Au-S с поверхностью золота и для связывания с флуоресцентной меткой с помощью второй функциональной группы. В случае НЧЗ-S-ПЭГ-NH₂ есть два варианта введения флуорофорной метки: NH₂-группа на поверхности НЧЗ реагирует с изотиоцинатом флуорофора в присутствии ЕДК [29] или с глутаральдегидом с последующим взаимодействием с аминофлуорофором [31]. Если же используют НЧЗ в форме НЧЗ-S-ПЭГ-COOH, то карбоксильную группу сначала активируют ЕДК и NHS и далее вводят в реакцию аминофлуорофор [31]. Последовательность этапов присоединения флуорофора к НЧЗ варьируют. В одних случаях сначала получают конъюгат флуорофора с линкером [19], а потом вводят его в реакцию с НЧЗ, в других – сначала получают конъюгат НЧЗ и линкера, а затем присоединяют флуорофор [32]. В случаях алкин-содержащего линкера возможно присоединение флуорофора в форме азива с использованием реакции азид-алкинового циклоприсоединения [30; 33]. Мы предлагаем методику введения флуорофора в форме изотиоцианата или N-гидроксисукцинилмидного эфира, являющихся более распространенными коммерчески доступными производными флуорофоров, чем их аминопроизводные. Реакцию проводили в два этапа согласно схеме 1:

Схема 1



Для контроля степени превращения реагентов в продукты реакции и специфичности их взаимодействия мы провели ряд контрольных экспериментов. Ранее нами было показано, что флуоресцеин с высокой эффективностью нековалентно адсорбируется на НЧЗ, покрытых цитратом [34]. Поэтому важно убедиться в ковалентном присоединении флуоресцеина по аминогруппам НЧЗ-NH₂. В первом контрольном эксперименте проводили инкубацию НЧЗ-ПЭГ и гексаметилендиамина без ЕДК-активирующего агента (НЧЗ-ПЭГ/NH₂-(CH₂)₆-NH₂). Во втором контрольном эксперименте инкубировали НЧЗ-ПЭГ с флуоресцеином (НЧЗ-ПЭГ/Flu, где / – нековалентная адсорбция). Полученные коньюгаты исследовали методами фотонно-корреляционной спектроскопии (ФКС) (табл. 1).

Таблица 1

Гидродинамический диаметр (d_h), ζ -потенциал и индекс полидисперсности (PdI) коньюгатов НЧЗ диаметром 13 нм (Zetasizer Nanoseries Nano ZS, «Malvern», США)

Шифр	Коньюгат	d_h , нм	ζ -потенциал, мВ	PdI
(0)	НЧЗ-13	19.0±0,5	-30±5	0.15±0,02
(1)	НЧЗ-ПЭГ-13	47±25	-45±4	0.27±0,05
(2)	НЧЗ-ПЭГ-13/ NH ₂ -(CH ₂) ₆ -NH ₂	108±13	-45±2	0.31±0,04
(3)	НЧЗ-NH ₂ -13	35±13	-33±3	0.20±0,04
(4)	НЧЗ-Flu-13	36±16	-48±1	0.25±0,03
(5)	НЧЗ-ПЭГ-13/Flu	46±25	-49±6	0.32±0,04

Коньюгаты (1), (2), (4), (5) имели ζ -потенциалом около -47 мВ, при этом ζ -потенциал коньюгатов (3) составил -33 мВ. Это может свидетельствовать о том, что часть карбоксильных групп коньюгата НЧЗ-ПЭГ прореагировала с диамином с образованием амидной связи, а поскольку рKa карбоксильной группы значительно больше, чем рKa амино-группы, то ζ -потенциал уменьшился. ζ -Потенциал НЧЗ-Flu уменьшился в сравнении с НЧЗ-NH₂ за счет отрицательного заряда карбоксильной группы флуоресцеина. Коньюгат (2) имеет значительно больший d_h , чем коньюгат (3). Вероятно, в присутствии ЕДК реакция НЧЗ-ПЭГ и диамина протекает с образованием ковалентной связи, а в отсутствие ЕДК происходит неселективная нековалентная сорбция NH₂-(CH₂)₆-NH₂ на поверхность НЧЗ за счет электростатических сил.

Гель-электрофорез в агарозном геле позволяет визуально без использования дополнительного окрашивания геля оценить НЧЗ по значению заряда и размера. Данный метод позволяет оценить эффективности протекания химической реакции (рис. 1).

Уменьшение электрофоретической подвижности НЧЗ-NH₂ (3, рис. 1А) по сравнению с НЧЗ-ПЭГ (1, рис. 1А) с учетом сравнимого диаметра этих коньюгатов и уменьшения ζ -потенциала указывает на ковалентное присоединение амино-группы в (3). Коньюгат (3, рис. 1А) мигрирует в геле однородной узкой полосой в отличие от коньюгата (2, рис. 1А), содержащего, по всей видимости, различное количество нековалентно сорбированных молекул гексаметилендиамина. Более высокий PdI коньюгатов (2) также свидетельствует об этом (табл. 1). Коньюгат НЧЗ-Flu (4, рис. 1А) имеет большую подвижность, чем его предшественник – НЧЗ-NH₂ (3, рис. 1А), что согласуется с данными ФКС о диаметре и ζ -потенциале. В то же время он отличается и от нековалентного коньюгата НЧЗ-ПЭГ/Flu (5, рис. 1А), образующего в геле широкую диффузную полосу более высокой подвижности, содержащую, по всей видимости, широкий спектр нековалентных ассоциатов НЧЗ-ПЭГ и флуоресцеина при сравнимых d_h и ζ -потенциале, но со значительно возросшим PdI. Мы оценили также гидродинамический диаметр и заряд исходных и модифицированных НЧЗ диаметром 6 нм в буфере 10 мМ Трис 1мМ ЭДТА pH 8,0 (табл. 2).

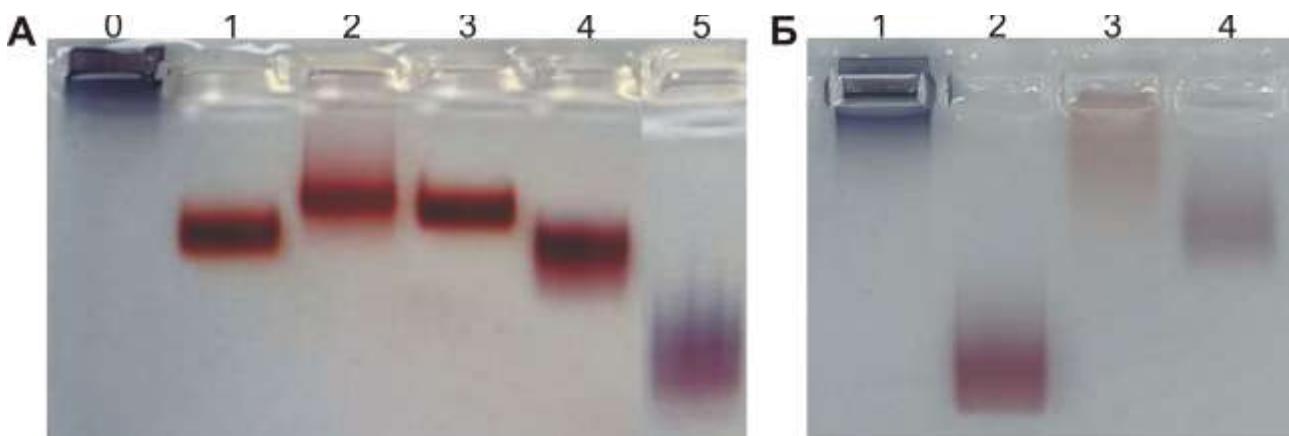


Рис. 1. Сравнение электрофоретической подвижности конъюгатов НЧЗ диаметром 13 нм в 0,4% агарозном геле (А): НЧЗ-13 (0), НЧЗ-ПЭГ-13 (1), НЧЗ-ПЭГ-13/ $\text{NH}_2\text{-}(\text{CH}_2)_6\text{-NH}_2$ (2), НЧЗ- NH_2 -13 (3), НЧЗ-Flu-13 (4), НЧЗ-ПЭГ-13/Flu (5). (Б) Сравнение электрофоретической подвижности исходных НЧЗ и целевых конъюгатов НЧЗ диаметрами 6 и 13 нм в 1,5% агарозном геле: НЧЗ-13 (1), НЧЗ-Flu-13 (2), НЧЗ-6 (3), НЧЗ-Flu-6 (4).

Представлены сканированные изображения гелей после электрофоретического разделения в буферном растворе Трис-глицина при 25 °С, напряженности электрического поля 5 В/см в течение 30 мин.

Таблица 2

Гидродинамический диаметр (d_h), ζ -потенциал и индекс полидисперсности (PdI) конъюгатов НЧЗ диаметром 6 нм

Характеристика	НЧЗ-6	НЧЗ-ПЭГ-6	НЧЗ- NH_2 -6	НЧЗ-Flu-6
d_h , нм	24.1 ± 18.4	31.4 ± 27.4	36.4 ± 32.4	98.6 ± 57.7
ζ -потенциал, мВ	-7.6 ± 1.7	-14.6 ± 6.0	-10.3 ± 2.2	-16.9 ± 2.8
PdI	0.36 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.39 ± 0.01	0.30 ± 0.05

Полученные конъюгаты НЧЗ диаметром 6 нм имеют отрицательный ζ -потенциал. Его качественное изменение по модулю для НЧЗ-6, НЧЗ-ПЭГ-6, НЧЗ- NH_2 -6, НЧЗ-Flu-6 определяется величиной электростатического заряда покрывающих лигандов, как и для конъюгатов НЧЗ диаметром 13 нм. Совместный анализ данных гель-электрофореза и ФКС косвенно свидетельствует о ковалентном присоединении флуоресцеина к исходным НЧЗ диаметром 6 нм (рис. 1 Б, табл. 2). Большая электрофоретическая подвижность 13-нм конъюгатов НЧЗ по сравнению с 6-нм конъюгатами согласуется со значениями ζ -потенциала.

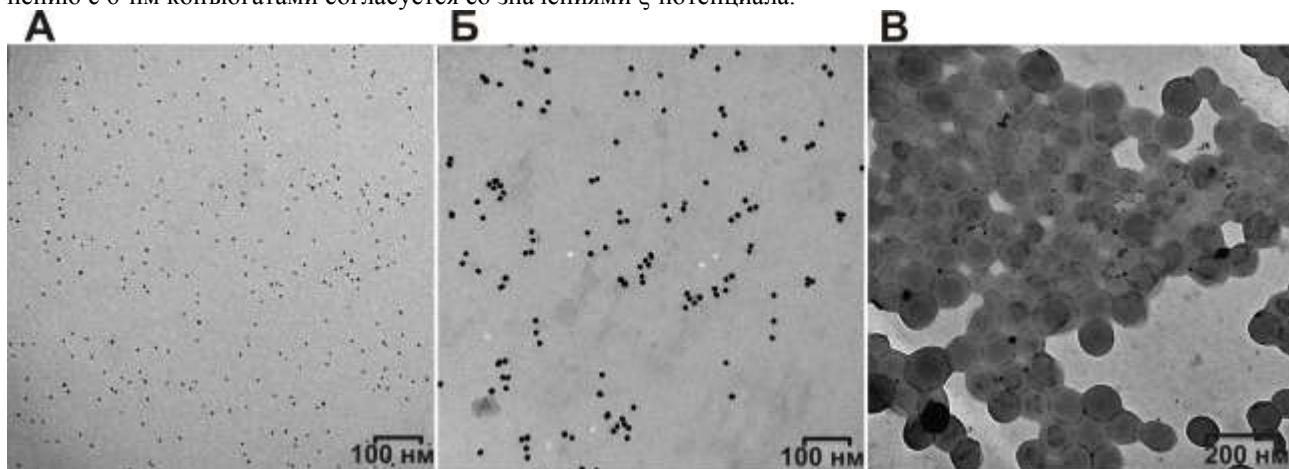


Рис. 2. Изображения ПЭМ, полученные с использованием просвечивающего электронного микроскопа высокого разрешения JEM 1400 (Jeol, Япония) со встроенной цифровой камерой производителя и цифровой камерой бокового ввода Veleta (SIS, Германия). (А) НЧЗ-Flu-6, выделенные центрифугированием в течение 1 ч при 100 000g; (Б) НЧЗ-Flu-13, выделенные центрифугированием в течение 30 мин ч при 16 100g; (В) НЧЗ-Flu-6, выделенные центрифугированием в течение 30 мин ч при 16 100g.

На всех этапах синтеза НЧЗ и их коньюгаты были исследованы методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Диаметр целевых НЧЗ-Flu-6 и НЧЗ-Flu-13, по данным ПЭМ, составил 6.1 ± 0.3 нм и 12.7 ± 0.2 нм (рис. 2 А, Б), агрегации частиц не наблюдали.

2. Особенности очистки целевых коньюгатов НЧЗ

Очевидно, что примесь непрореагированного остатка флуоресцеина в препарате НЧЗ-Flu может привести к некорректной интерпретации результатов экспериментов *in vivo* и *in vitro*. Для отделения модифицированных НЧЗ от избытка реагентов, как правило, используют метод седиментации. Чтобы количественно получить НЧЗ диаметром 13 нм, достаточно центрифугирования (ЦФ) в течение 30 мин при 16 100 г. При работе с НЧЗ диаметром 6 нм мы столкнулись с проблемой очистки реакционной смеси от избытка реагентов (рис. 2В). Даже при увеличении продолжительности центрифугирования наночастиц в 2,5 раза выход целевого продукта НЧЗ-Flu-6 составил не более 11% (табл. 3). Поэтому мы проверили на каждом этапе синтеза коньюгатов НЧЗ-6 разные способы очистки целевого продукта реакции. Ниже, на примере последнего этапа синтеза, приведены физико-химические характеристики коньюгатов при разных способах их очистки (табл. 3).

Таблица 3

Сравнение физико-химических свойств НЧЗ-Flu-6 после разных способов очистки, методом динамического светорассеяния в буфере Tris-ЭДТА pH 8,0

Метод*	целевые НЧЗ, %	d_h , нм	ζ , мВ	PdI
№ 1	11	172.2 ± 73.7	-2.4 ± 2.1	0.244
№ 2	46	142.8 ± 53.3	-10.4 ± 2.6	0.305
№ 3	(не оценено)	21.2 ± 10.5 (50%), 114.6 ± 58.3 (50%)	-22.4 ± 1.4	0.619
№ 4	100	98.6 ± 57.7	-16.9 ± 2.8	0.299

*№1 – ЦФ 75 мин, 16 100 г; №2 – ЦФ в вязкой среде (84% сахароза) 50 мин, 16 100 г; №3 – диализ через мембрану 30 нм в Tris-ЭДТА pH 8,0, 16 ч; №4 – ЦФ 1 ч, 100 000г.

Видно, что использование метода №4 (центрифугирование при 100 000 г в течение 1 ч) привело к количественному выделению целевых коньюгатов НЧЗ. Коньюгаты были монодисперсны (PdI 0,299, табл. 3). В остальных случаях наблюдали агрегацию целевых коньюгатов (данные ПЭМ не представлены) и низкий выход целевого продукта.

3. Спектроскопические исследования полученных коньюгатов НЧЗ

По литературным данным коэффициенты молярного поглощения при 520 нм для НЧЗ диаметром 6 и 13 нм составляют $8.56 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ и $8.78 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ соответственно [35], т.е. (при равной концентрации) НЧЗ диаметром 13 нм – более удобный для визуального контроля объект исследования, чем НЧЗ диаметром 6 нм (рис. 3 А).

Спектр оптического поглощения НЧЗ-Flu-6 значительно отличается от спектра исходных НЧЗ-6 и имеет характерный для флуоресцеина максимум при 495 нм (рис. 3 Б).

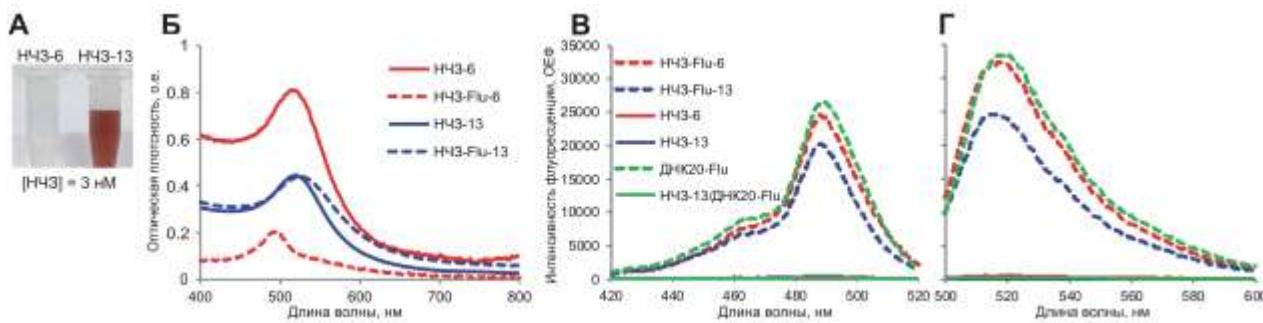


Рис. 3. (А) Фотография образцов НЧЗ диаметрами 6 и 13 нм при концентрации НЧЗ 3 нМ.

Спектры оптического поглощения (Б), возбуждения флуоресценции (В)

и испускания флуоресценции (Г) образцов.

Спектроскопические измерения выполнены на флуориметре Clariostar (BMG LABTECH, Германия).

Спектры возбуждения (рис. 3 В) и испускания (рис. 3 Г) флуоресценции исходных НЧЗ диаметрами 6 и 13 нм, их коньюгатов с флуоресцеином НЧЗ-Flu-6 и НЧЗ-Flu-13 мы сравнили с таковыми для флуоресцеин-меченной ДНК20-Flu и нековалентного коньюгата НЧЗ-13/ДНК20-Flu. Показано, что коньюгаты НЧЗ-Flu-6 и НЧЗ-Flu-13 с ковалентно присоединенным флуоресцеином флуоресцируют, в то время как спектры поглощения и испускания коньюгата НЧЗ-13 с нековалентно адсорбированной на нем флуоресцеин-меченной ДНК не имеют характерных максимумов (НЧЗ-13/ДНК20-Flu, рис. 3 В, Г), вероятно, из-за близкого расположения флуоресцеина относи-

тельно поверхности НЧЗ. Интенсивность флуоресценции 2.5 нМ НЧЗ-Flu-6 сопоставима с интенсивностью флуоресценции 49 нМ ДНК20-Flu, в то время как интенсивность флуоресценции 2.5 нМ НЧЗ-Flu-13 аналогичной концентрации соответствует интенсивности флуоресценции 37 нМ ДНК20-Flu (во всех случаях $\lambda_{em} = 530$ нм, $\lambda_{ex} = 483$ нм). Мы рассчитали емкость (количество) молекул флуоресцина на одну НЧЗ диаметром 13 нм, которое составило 16 ± 4 остатка. Следовательно, остаток флуоресцина в составе конъюгата с НЧЗ-13 характеризуется интенсивностью флуоресценции на уровне флуорофора в составе олигонуклеотида с той же молярной концентрацией.

Оценка длины используемого нами линкера на основе измерения кинематической вязкости молекул ПЭГ [36] составила более 4 нм, а с использованием HyperChem 8.0.8 – 26.1 нм. В литературе представлены разные данные о расстояниях между меткой и НЧЗ, необходимые и достаточные для эффективной флуоресценции. Известно, что удаления флуорофора Cy5 на 10 нм от плоской поверхности стекла с присоединенными НЧЗ [25] и на 5 нм от сферических НЧЗ [18] достаточно для преодоления тушения. В работе [37] было показано, что для преодоления тушения поверхностью НЧЗ ($d = 8$ –16 нм) флуоресценции красителя на основе индоцианинового зеленого, значительно отличающимся от флуоресцина, с квантовым выходом 0.012 и 0.93 и максимумами испускания 830 нм и 521 нм, превышающими длину волн плазмонного резонанса НЧЗ, было достаточно полиэтиленгликолового линкера длиной 3.6 нм (оценка с использованием HyperChem 8.0.8). Таким образом, эти расстояния зависят и (i) от типа НЧЗ, и (ii) от типа флуоресцентной метки, а также (iii) от того, находится НЧЗ в растворе или на поверхности, и выбор линкера является многопараметрической задачей для каждого типа флуоресцирующих НЧЗ.

При интенсивном развитии методов биовизуализации опухолей *in vivo* с применением НЧЗ, конъюгированных с флуорофорами, в комбинации с высокочувствительными методами детекции (рамановское рассеяние света, компьютерная томография и др.) [38–40] широкое практическое применение этих методов затруднено из-за низкой глубины проникновения рассеянного света в образцы тканей [40]. Полученные нами флуоресцирующие конъюгаты НЧЗ успешно проникали в клетки линий NCI-H23 и A549 (аденокарциномы легкого), BrCC4e-134 (аденокарциномы молочной железы) и uMe11 (увеальной меланомы) [42]. Показано, что жизнеспособность указанных клеточных линий снижалась при их обработке данными флуоресцирующими конъюгатами НЧЗ в сочетании с облучением холодной плазменной струей [42], т.е. помимо диагностического приложения данные конъюгаты НЧЗ обладают и терапевтическим потенциалом. Использованные в работе НЧЗ не оказывали токсического воздействия на лабораторных мышей в дозе 35 мкг/животное, что согласуется с литературными данными [43]. Наши результаты демонстрируют высокий потенциал флуоресцирующих НЧЗ в диагностике онкологических заболеваний с улучшением характеристик метода биовизуализации опухолей *in vivo* за счет сочетания флуоресценции и уникальных физико-химических свойств НЧЗ.

Заключение

Разработан способ ковалентного присоединение флуоресцина через линкер $-S\text{-ПЭГ-NH-(CH}_2\text{)}_6\text{-NH-}$ к НЧЗ двух различных диаметров (6 и 13 нм), позволяющий полностью преодолеть эффект тушения флуоресценции поверхностью золота. Изложена методика синтеза и очистки конъюгатов НЧЗ с флуоресцином. Представленный подход технологически прост, не требует синтеза флуорофоров со специфическими спектральными характеристиками и позволяет получать флуоресцирующие конъюгаты НЧЗ и любого коммерчески доступного красителя, излучающего в нужном диапазоне длин волн с учетом конкретной задачи по визуализации. Полученные результаты расширяют возможности применения методов биовизуализации в диагностике онкологических заболеваний.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ИХБФМ СО РАН М. И. Мещаниновой, Е. В. Дмитриенко и О. А. Коваль за обсуждение результатов.

Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН №125012300656-5.

ЛИТЕРАТУРА

1. Daraee H., Eatemadi A., Abbasi E., Fekri Aval S., Kouhi M., Akbarzadeh A. Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery // Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology. 2016. Vol. 44. No. 1. P. 410–422.
2. Wu Y., Ali M. R. K., Chen K., Fang N., El-Sayed M.A. Gold nanoparticles in biological optical imaging // Nanotoday. 2019. Vol. 24. P. 120–140.
3. Thomas K. G., Kamat P. V. Chromophore-functionalized gold nanoparticles // Accounts of chemical research. 2003. Vol. 36. No. 12. P. 888–898.
4. Huang H., Liu R., Yang J., Dai J., Fan Sh., Pi J., Wei Yu., Xinrong G. Gold nanoparticles: construction for drug delivery and application in cancer immunotherapy // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15. No. 7. P. 1868.
5. De Jong W. H., Hagens W. I., Krystek P., Burger M. C., Sips A.J.A.M., Geertsma R. E. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration // Biomaterials. 2008. Vol. 29. No. 12. P. 1912–1919.
6. Hirn S., Semmler-Behnke M., Schleh C., Wenk A., Lipka J., Schäffler M., Takenaka Sh., Möller W., Schmid G., Simon U., Kreyling W. G. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2011. Vol. 77. No. 3. P. 407–416.
7. Aljohani F. S., Tarek M., Bakr B. A., Hamdy Ya., Abu-Serie M., Awaad A., Elkady H., Elvakil B. H. In vivo bio-distribution and acute toxicity evaluation of greenly synthesized ultra-small gold nanoparticles with different biological activities // Scientific Reports. 2022. Vol. 12. No. 1. P. 6269.
8. Xia Q., Huang J., Feng Q., Chen X., Liu X., Li X., Zhang T., Xiao Sh., Li H., Zhong Zh., Xiao K. Size-and cell type-dependent cellular uptake, cytotoxicity and in vivo distribution of gold nanoparticles // International Journal of Nanomedicine. 2019. Vol. 14. P. 6957–6970.
9. Chen Yu-S., Hung Yao-Ch., Liao I., Huang G. S. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles // Nanoscale Research Letters. 2009. Vol. 4. P. 858–864.

10. Zhang X.-D., Wu H.-Y., Wu D., Wang Y.-Y., Chang J.-H., Zhai Zh.-B., Meng A.-M., Liu P.-X., Zhang L.-A., Fan F.-Y. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes // International Journal of Nanomedicine. 2010. Vol. 5. P. 771–781.
11. Li X., Hu Z., Ma J., Wang X., Zhang Ya., Wang W., Yuan Zh. The systematic evaluation of size-dependent toxicity and multi-time biodistribution of gold nanoparticles // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2018. Vol. 167. P. 260–266.
12. Soenen S. J., Manshian B. B., Abdelmonem A. M., Montenegro J.-M., Tan S., Balcaen L., Vanhaecke F., Brisson A. R., Parak W. J., De Smedt S. C., Braeckmans K. The cellular interactions of PEGylated gold nanoparticles: effect of PEGylation on cellular uptake and cytotoxicity // Particle & Particle Systems Characterization. 2014. Vol. 31. No. 7. P. 794–800.
13. Arnida, Malugin A., Ghandehari H. Cellular uptake and toxicity of gold nanoparticles in prostate cancer cells: a comparative study of rods and spheres // Journal of Applied Toxicology. 2010. Vol. 30. No. 3. P. 212–217.
14. Zhang Y., Liu A. T., Cornejo Y. R., Van Haute D., Berlin J. M. A Systematic comparison of in vitro cell uptake and in vivo biodistribution for three classes of gold nanoparticles with saturated PEG coatings // PloS One. 2020. Vol. 15. No. 7. Art. 0234916.
15. Wu Y., Ali M.R.K., Dansby K., El-Sayed M. A. Improving the flow cytometry-based detection of the cellular uptake of gold nanoparticles // Analytical Chemistry. 2019. Vol. 91. No. 22. P. 14261–14267.
16. Park J., Ha M. K., Yang N., Yoom T. H. Flow cytometry-based quantification of cellular Au nanoparticles // Analytical Chemistry. 2017. Vol. 89. No. 4. P. 2449–2456.
17. Liu J. Adsorption of DNA onto gold nanoparticles and graphene oxide: surface science and applications // Physical Chemistry Chemical Physics. 2012. Vol. 14. No. 30. P. 10485–10496.
18. Anger P., Bharadwaj P., Novotny L. Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence // Physical Review Letters. 2006. Vol. 96. No. 11. Art. 113002.
19. Lee H., Lee K., Kim I. K., Park T. G. Synthesis, characterization, and in vivo diagnostic applications of hyaluronic acid immobilized gold nanoprobes // Biomaterials. 2008. Vol. 29. No. 35. P. 4709–4718.
20. Lee S., Cha E.-J., Park K., Lee S.-Y., Hong J.-K., Sun I.-Ch., Kim S. Y., Choi K., Kwon I. Ch., Kim K., Ahn Ch.-H. A near- infrared- fluorescence- quenched gold- nanoparticle imaging probe for in vivo drug screening and protease activity determination // Angewandte Chemie International Edition. 2008. Vol. 47. No. 15. P. 2804–2807.
21. Qin H., Ma D., Du J. Distance dependent fluorescence quenching and enhancement of gold nanoclusters by gold nanoparticles // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2018. Vol. 189. P. 161–166.
22. Zhang X.-D., Wu D., Shen X., Liu.-X., Yang N., Zhao B., Zhang H., Sun Y.-M Zhang., L.-A., Fan F.-Y. Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles // International journal of nanomedicine. 2011. Vol. 6. P. 2071–2081.
23. David S., Patel D. Y., Cardona S. M., Kirby N., Mayer K. M. Cellular uptake and cytotoxicity of PEGylated gold nanoparticles in C33A cervical cancer cells // Nano Express. 2022. Vol. 3. No. 2. Art. 025006.
24. Brandenberger C., Mühlfeld C., Ali Z., Lenz A.-G., Schmid O., Parak W. J., Gehr P., Rothen-Rutishauser B. Quantitative evaluation of cellular uptake and trafficking of plain and polyethylene glycol- coated gold nanoparticles // Small. 2010. Vol. 6. No. 15. P. 1669–1678.
25. Dulkeith E., Ringler M., Klar T. A., Feldmann J., Javier A. M., Parak W. J. Gold nanoparticles quench fluorescence by phase induced radiative rate suppression // Nano letters. 2005. Vol. 5. No. 4. P. 585–589.
26. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // Nat. Phys. Sci. 1973. Vol. 241. P. 20–22.
27. Xue C., Millstone L. E., Li S., Mirklin Ch. A. Plasmon- driven synthesis of triangular core–shell nanoprisms from gold seeds // Angewandte Chemie International Edition. 2007. Vol. 46. No. 44. P. 8436–8439.
28. Poothiyil V., Lindhorst T. K., Golovko V. B., Fairbanks A. J. Recent applications of click chemistry for the functionalization of gold nanoparticles and their conversion to glyco-gold nanoparticles // Beilstein Journal of Organic Chemistry. 2018. Vol. 14. No. 1. P. 11–24.
29. Hao Y., Yang X., Shi Y., Song S., Xing J., Marowitch J., Chen J., Chen J. Magnetic gold nanoparticles as a vehicle for fluorescein isothiocyanate and DNA delivery into plant cells // Botany. 2013. Vol. 91. No. 7. P. 457–466.
30. Gobbo P., Mossman Z., Nazemi A., Niaux A., Biesinger M. C., Gillies E. R., Workentin M. S. Versatile strained alkyne modified water-soluble AuNPs for interfacial strain promoted azide–alkyne cycloaddition (I-SPAAC) // Journal of Materials Chemistry B. 2014. Vol. 2. No. 13. P. 1764–1769.
31. Alba-Patiño A., Russel S. M., Borges M., Pazos-Perez N., Alvarez-Puebla R. A., de la Rica R. Nanoparticle-based mobile biosensors for the rapid detection of sepsis biomarkers in whole blood // Nanoscale Advances. 2020. Vol. 2. No. 3. P. 1253–1260.
32. Lu Y., Dasog M., Leontowich A.F.G., Scott R.W.J., Paige M. F. Fluorescently labeled gold nanoparticles with minimal fluorescence quenching // The Journal of Physical Chemistry C. 2010. Vol. 114. No. 41. P. 17446–17454.
33. Brennan J. L., Hatzakis N. S., Tshikhudo T. R., Tshikhudo, Dirvianskyte N., Razumas V., Patkar Sh., Vind J., Svendsen A., Nolte R.J.M., Rowan A.E., Brust M. Bionanoconjugation via click chemistry: The creation of functional hybrids of lipases and gold nanoparticles // Bioconjugate Chemistry. 2006. Vol. 17. No. 6. P. 1373–1375.
34. Epanchintseva A. V., Gorbunova E. A., Ryabchikova E. I., Pyshnaya I. A., Pyshnyi D. V. Effect of fluorescent labels on DNA affinity for gold nanoparticles // Nanomaterials. 2021. Vol. 11. No. 5. P. 1178.
35. Liu X., Atwater M., Wang J., Huo Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2007. Vol. 58. No. 1. P. 3–7.
36. Masimov E. A., Pashayev B. G., Gasanov G. S., Gadzhieva S. N. Viscometric determination of the conformations and sizes of polyethylene glycol macromolecules in aqueous solutions // Russian Journal of Physical Chemistry A. 2019. Vol. 93. No. 6. P. 1054–1058.
37. Wang J., Moore J., Laulhe S., Nantz M., Achilefu S., Kang K. A. Fluorophore-gold nanoparticle complex for sensitive optical biosensing and imaging // Nanotechnology. 2012. Vol. 23. No. 9. Art. 095501.
38. Jang B., Park J.-Y., Tung Ch.-H., Kim I.-H., Choi Y. Gold nanorod-photosensitizer complex for near-infrared fluorescence imaging and photodynamic/photothermal therapy in vivo // ACS nano. 2011. Vol. 5. No. 2. P. 1086–1094.
39. Qian J., Jiang L., Cai F., Wang D., He.S. Fluorescence-surface enhanced Raman scattering co-functionalized gold nanorods as near-infrared probes for purely optical in vivo imaging // Biomaterials. 2011. Vol. 32. No. 6. P. 1601–1610.
40. Hayashi K., Nakamura M., Miki H., Ozaki Sh., Abe M., Matsumoto T., Ishimura K. Gold nanoparticle cluster-plasmon-enhanced fluorescent silica core-shell nanoparticles for X-ray computed tomography-fluorescence dual-mode imaging of tumors // Chemical Communications. 2013. Vol. 49. No. 46. P. 5334–5336.
41. Banstola A., Emami F., Jeong J.-H., Yook S. Current applications of gold nanoparticles for medical imaging and as treatment agents for managing pancreatic cancer // Macromolecular Research. 2018. Vol. 26. P. 955–964.
42. Schweigert I., Biryukov M., Polyakova A., Krychko N., Gorbunova E., Epanchintseva A., Pyshnaya I., Zakrevsky D., Milakhina E., Koval O. Pulsed voltage cold atmospheric plasma jet and gold nanoparticles enhance cytotoxic anticancer effect // Journal of Physics D: Applied Physics. 2024. Vol. 57. No. 25. Art. 255205.
43. Cai Z., Yook S., Lu Y., Bergstrom D., Winnik M. A., Pignol J.-Ph., Reilly R. M. Local radiation treatment of HER2-positive breast cancer using trastuzumab-modified gold nanoparticles labeled with ¹⁷⁷Lu // Pharmaceutical Research. 2017. Vol. 34. P. 579–590.

APPROACH FOR OBTAINING FLUORESCENT GOLD NANOPARTICLES

© E. A. Gorbunova*, A. V. Epanchintseva, I. A. Pyshnaya

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS
8 Academician Lavrentiev pr, 630090 Novosibirsk, Russia**Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,***Email: gorbunova-ekaterina@inbox.ru*

Fluorophore-conjugated gold nanoparticles (GNPs) are in high demand for the development of diagnostic tools for diseases, including cancer. We have described a method of covalent attachment of fluorescein to GNPs with a diameter of 12.7 (GNP-13) and 6.1 nm (GNP-6) via a linker $-PEG_{71}-NH-(CH_2)_6-NH-$, allowing to separate the GNP and fluorophore in space to a distance necessary to overcome the effect of fluorescence quenching by the GNP surface. The obtained fluorescent GNP conjugates can be effectively used for biovisualization of tumor tissues *in vivo*.

Keywords: gold nanoparticles, fluorescence, bioimaging, polyethyleneglycol, fluorescein.

Received 19.05.2025.

Об авторах / About the authors

ГОРБУНОВА Екатерина Андреевна

Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Россия
инженер первой категории
лаборатории биомедицинской химии
gorbunova-ekaterina@inbox.ru
Web of Science Researcher ID: ABC-7310-2021

GORBUNOVA Ekaterina Andreevna

Institute of Chemical Biology
and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS, Russia
First category engineer
of the Laboratory of Biomedical Chemistry
gorbunova-ekaterina@inbox.ru
ORCID: 0000-0002-5391-5322
Web of Science Researcher ID: ABC-7310-2021
Scopus Author ID: 58454212800

ЕПАНЧИНЦЕВА Анна Валерьевна

Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Россия
к.х.н., н.с. лаборатории биомедицинской химии
annaepanch@gmail.com
Web of Science Researcher ID: R-4095-2017

EPANCHINTSEVA Anna Valerjevna

Institute of Chemical Biology
and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS, Russia
Candidate of Chemical Sciences,
Researcher of the Laboratory of Biomedical Chemistry
annaepanch@gmail.com
ORCID: 0000-0003-4720-4564
Web of Science Researcher ID: R-4095-2017
Scopus Author ID: 57193308282

ПЫШНАЯ Инна Алексеевна

Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН, Россия
к.х.н., с.н.с лаборатории биомедицинской химии
pyshnaya@niboch.nsc.ru
Web of Science Researcher ID: F-9519-2013

PYSHNAYA Inna Alekseevna

Institute of Chemical Biology
and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAS, Russia
Candidate of Chemical Sciences,
Senior Researcher of the Laboratory of Biomedical Chemistry
pyshnaya@niboch.nsc.ru
ORCID: 0000-0002-7559-2376
Web of Science Researcher ID: F-9519-2013
Scopus Author ID: 6603033141