

АННОТИРОВАННЫЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ОТЧЕТ
О РЕЗУЛЬТАТАХ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЕННЫХ
НА ЭТАПЕ № 1

«Создание экспериментальных макетов биосенсоров»

Соглашение от «13» августа 2012 г. №. 14.В37.21.0563.

Тема: «Разработка когерентно-оптических биосенсоров на генетическом, клеточном и организменном уровнях организации».

Исполнитель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Ключевые слова: биосенсоры, наночастицы, наноконпозиты, когерентно-оптические и спектральные методы, фототерапия.

1. Цель проекта

1.1. *Формулировка задачи / проблемы, на решение которой направлен реализованный проект* Разработка новой технологической платформы высокочувствительных оптических биосенсоров.

1.2. *Формулировка цели реализованного проекта, места и роли результатов проекта в решении задачи / проблемы, сформулированной в п. 1.* Создание прототипа нового высокочувствительного неинвазивного оптического биосенсора на основе поверхностного плазмонного резонанса наночастицы коллоидного золота для лабораторной диагностики социально-значимых и других актуальных инфекций.

Создание прототипа биосенсора для анализа чувствительности микроорганизмов к совместному действию оптических излучений и наночастиц.

Создание прототипа лазерного сенсора, реализующего метод анализа временного и пространственного контраста спекл-полей, формирующихся при рассеянии когерентного излучения в бактериальных колониях, выращиваемых на плотном агаре. В качестве сенсорного звена выступают бактериальные колонии, реагирующие на изменение внешних условий.

Создание прототипа лазерного сенсора, реализующего метод анализа временного и пространственного контраста спекл-полей, формирующихся при рассеянии когерентного излучения в головном мозге лабораторных животных, реагирующие на введение тестируемых медицинских препаратов.

2. Основные результаты проекта

2.1. *Краткое описание основных полученных результатов (основные теоретические и экспериментальные результаты, фактические данные, обнаруженные взаимосвязи и закономерности, характеристики созданной научной продукции)/ Указание основных характеристик созданной научной продукции (при наличии научной продукции).* Изучены физико-химические и оптические характеристики нанопорошков, нанопроволок диоксида титана, а также гипсовых пленок, содержащих наноразмерный диоксид титана, прокаленных в азотной, аммиачной и водородной атмосферах. Исследовано влияние действия светодиодного синего (405 нм; 70 мВт/см²) излучения, а также нанопорошков, нанопроволок и нанопленок диоксида титана, допированных N₂, NH₃, Pd на численность бактерий *S. aureus* 209 P. Показано, что наибольшей антибактериальной активностью обладают пленки наночастиц диоксида титана, прокаленные в атмосфере азота и обработанные палладием, сокращение численности

популяции золотистого стафилококка при этом отмечено на 97% после 30 мин облучения синим светом.

Подобраны оптимальные комплекующие биосенсора – носители для твердой фазы, элюирующих буферов и хроматографических ингредиентов. Приготовлены иммунобиоконъюгаты с использованием наночастиц коллоидного золота оптимальных размеров (20 и 40 нм). Разработаны и оптимизированы методы иммобилизации активных компонентов экспериментального биосенсора на твердой фазе и условия амплификации специфического сигнала.

Проведена разработка экспериментального макета лазерного сенсора, реализующего метод анализа временного и пространственного контраста спекл-полей, формирующихся при рассеянии когерентного излучения в бактериальных колониях, выращиваемых на плотном агаре. Проведено исследование влияния спекл-модулированных биоспеклов на результаты измерений скорости роста бактериальных колоний. Показана необходимость использования специально разработанных сред с малым рассеянием лазерного излучения.

Показана возможность создания сенсоров на основе наночастиц ZnCdS, интенсивность и положение максимума полосы люминесценции которых зависят от температуры окружающей среды и концентрации глюкозы. Такие сенсоры дают информацию о концентрации глюкозы при введении в образец пероксидазы и образования, в результате, перекиси водорода. Смещение положения максимума составляет 0.1 нм/градус, что, при точном измерении, позволяет регистрировать распределение температуры на клеточном уровне. Кроме того, данные наночастицы позволяют наблюдать люминесценцию при двухфотонном лазерном возбуждении. В результате появляется возможность объединения фототерапевтического воздействия и контроля температуры при использовании лазерного возбуждения с длиной волны в диапазоне 800–830 нм.

Проведена разработка лабораторного образца лазерного биосенсора - спекл-кореллометра полного поля для функциональной оценки микроциркуляции в коре головного лабораторных крыс. Проведена экспериментальная апробация метода спекл-кореллометрии полного поля для мониторинга изменений состояния микроциркуляции коры головного мозга лабораторных крыс при введении сосудорасширяющих и сосудосуживающих агентов, также были проведены экспериментальные измерения динамики скорости потока взвеси полимерных частиц в специально разработанных фантомах на основе слоев полимеров. Были проведены исследования по выбору оптимальных условий формирования и регистрации спекл-изображений и создано программное обеспечение, реализующее адаптивный алгоритм обработки результатов измерений.

Проведена разработка флуоресцентных биомаркеров, позволяющих локализовать патологические биоткани в организме. Проведение экспериментальных исследований по выявлению особенностей флуоресценции наноконструкций, включающих золотые наностержни и оболочку из мезопористого оксида кремния, допированную молекулами гематопорфирина, в зависимости от органа локализации.

2.2. Описание новизны научных результатов. Впервые изучены антимикробные фотокаталитические свойства наночастиц диоксида титана, допированных N₂, NH₃, Pd, в сочетании с синим (405 нм) светодиодным излучением. Показаны изменения в фотокаталитической активности синтезированных наночастиц в зависимости от типа газовой атмосферы, скорости нагрева и температуры прокаливания. Показана принципиальная возможность использования методов t-LASCA и s-LASCA для мониторинга роста бактериальных колоний, а также возможность создания оптического биосенсора на клеточном и тканевом уровнях организации для мониторинга липолиза жировых клеток или образования пор в мембране любых других клеток под действием химических или физических стрессов. С применением, разработанного алгоритма и

программного обеспечения для корреляционного анализа изображений спекл-структур, были получены результаты, позволяющие детектировать изменения микроциркуляции при введении сосудорасширяющих и сосудосужающих агентов. При этом пространственное разрешение восстановленного изображения составляло 15 мкм. Таким образом, метод спекл-коррелометрии позволяет в режиме реального времени отслеживать изменения состояния церебральной микроциркуляции у лабораторных крыс.

2.3. Сопоставление с результатами аналогичных работ мирового уровня. В ряде аналогичных исследований показано, что наноразмерные частицы диоксида титана в сочетании с УФ-излучением обладают антимикробной активностью в отношении таких бактерий как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, а также находят применение в очистке объектов окружающей среды от биологического загрязнения. В наших исследованиях для воздействия использовались новые модификации наночастиц диоксида титана, обладающие более эффективным поглощением света в длинноволновой области, и позволяющие расширить круг применения метода фотовоздействия.

Чувствительность полупроводниковых наночастиц к температуре сопоставима с известными результатами для наночастиц CdSe, однако, использование полупроницаемой стабилизирующей полимерной оболочки повышает чувствительность люминесценции наночастиц к концентрации глюкозы.

При разработке лазерного биосенсора и программного обеспечения для спекл-корреляционного анализа изображений был проведен анализ наиболее успешных модификаций метода LASCA применительно к функциональному анализу микроциркуляции.

Композитные наночастицы, содержащие слой мезопористого кварца, являются одними из наиболее перспективных носителей для повышения селективности аккумуляции фотосенсибилизаторов в опухолевой ткани. Основными преимуществами таких наночастиц являются большой объем пор и соответственно площадь активируемой поверхности, что позволяет осуществлять их допирование неагрегированными молекулами сенсibilизатора. Кроме того, наноструктуры на основе кремния являются биосовместимыми и могут быть легко функционализированы различными молекулярными метками.

3. Назначение и область применения результатов проекта

3.1. Описание областей применения полученных результатов (области науки и техники; отрасли промышленности и социальной сферы, в которых могут или уже используются полученные результаты или созданная на их основе инновационная продукция). Результат данного исследования может быть востребован в медицине при борьбе с микроорганизмами-возбудителями инфекционных заболеваний и слизистых, в экологической микробиологии для контроля состояния и очистки объектов окружающей среды (воды, почвы, воздуха) от биологического загрязнения (в том числе и бактериального), для стерилизации и обеззараживания различных материалов.

3.2. Перспективы практического применения и коммерциализации результатов проекта

3.2.1. Описание направлений практического внедрения полученных результатов или перспектив их использования. Разрабатываемые в рамках настоящего проекта биосенсоры являются перспективным как для клинической лабораторной диагностики в научно-исследовательских лабораториях, для получения сведений об заболеваемости, для экспресс-оценки чувствительности патогенных бактерий или представителей нормальной микрофлоры к совместному действию наночастиц и излучения, для снижения вреда, причиняемого макроорганизмам, мониторинга экологического состояния окружающей среды и оценки степени загрязненности земель сельскохозяйственного назначения, а

также для морфо-функционального анализа биологических объектов со сложной микроструктурой поверхности и динамикой рассеивающих центров.

3.2.2. *Оценка или прогноз влияния полученных результатов на развитие научно-технических и технологических направлений; на разработку новых технических решений; на изменение структуры производства и потребления товаров и услуг в соответствующих секторах рынка и социальной сферы.* Полученные результаты позволяют выявить закономерности влияния условий обработки наночастиц диоксида титана на их фотокаталитическую активность, что позволит в дальнейшем синтезировать наночастицы с необходимыми свойствами. Использование данного метода позволяет повысить эффективность антибактериальной фототерапии, а также сделать этот вид лечения инфекционных заболеваний более экономически доступным. Разработанный лазерный биосенсор, на основе спекл-кореллометрии полного поля имеет приложения не только в области медицинской и ветеринарной диагностики, для функциональной оценки микроциркуляции, но и в технологии, например, для оценки диффузии жидких сред в пористых материалах или для мониторинга процессов полимеризации на различных стадиях формирования структуры полимеризируемой субстанции и ЖК в режиме реального времени. Разработанный алгоритм для специализированного программного комплекса обработки изображений, применительно к функциональному мониторингу церебральной микроциркуляции может быть использован для других приложений, например для обработки ОКТ изображений.

3.2.3. *Описание ожидаемых социально-экономических и др. эффектов от использования товаров и услуг, созданных на основе полученных результатов (повышение производительности труда, снижение материало- и энергоёмкости производства, уменьшение отрицательного техногенного воздействия на окружающую среду, снижение риска смертности, повышение качества жизни и т.п.).* Развитие предложенных методов позволит снизить материальные затраты на апробирование и применение фотовоздействия на микроорганизмы, повысить качество жизни пациентов, страдающих инфекционными заболеваниями кожи и слизистых, сократить время обучения персонала этому новому методу фототерапии.

3.2.4. *Описание существующих или возможных форм коммерциализации полученных результатов: организация производства продукции и/или оказание услуг, в том числе с образованием нового юридического лица или без него; заключение лицензионных договоров, заключение договоров уступки прав на РИД. Либо указывается: «Коммерциализация проектом не предусмотрена».* Использование разработанных сенсоров и методов может являться одной из форм услуг по лечению инфекционных заболеваний кожи и слизистых в медицинских и ветеринарных учреждениях.

3.2.5. *Описание видов новой и усовершенствованной продукции (услуги), которые могут быть созданы или уже созданы на основе полученных результатов интеллектуальной деятельности (РИД); указание предполагаемых или фактических рынков сбыта.* На настоящий момент РИД не получены, сделаны предпосылки для последующего патентования.

4. Перспективы развития исследований

Краткая информация о перспективах развития выполненного в ходе выполнения проекта исследования.

1) *Информация о том, насколько участие в ФЦП способствовало формированию новых исследовательских партнерств. Участвует ли научный коллектив в проектах по 7-й рамочной Программе Евросоюза (с указанием названия проектов и перечня партнеров по ним).* Исследования проходили в контакте с учеными США, Англии, Австралии, Кореи, Германии, Китая, Бельгии, Ирландии и других. Институт оптики и биофотоники СГУ – ассоциированный партнер–Center of Biophotonics Science and Technology (CBST) and Canadian Institute for Photonics Innovation (CIPI). Выполняется проект «Network of excellence for biophotonics» по 7-й рамочной программе (Grant № 224014

PHOTONICS4LIFE of FP7-ICT-2007-2): IPHT, Jena (Coordinator), University of Muenster, Германия; University of Twente, Нидерланды; Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara", Италия; CNRS - Institut d'Optique graduate school, Франция; Vrije Universiteit Brussel, Бельгия; University of St. Andrews, Великобритания; Imperial College London, Великобритания; ICFO-Barcelona, Испания; Technical Research Centre of Finland, Финляндия; Forschungszentrum Karlsruhe, Германия; Lund University, Швеция.

2) *Краткая информация о проектах научного коллектива по аналогичной тематике.* - «The developing of research infrastructure and approaches to optical point-of-care medical diagnostics», программа: Institutional Partnership (SCOPE5) EC Project Adkhamjon Paiziev, Uzbek Academy of Science, Uzbekistan, Martin Wolf, University Hospital Zurich, Switzerland - «Biophotonic technologies for novel diagnostic and therapeutic applications», программа: FiDiPro Professor (Finland Distinguished Professor Program, awarded by TEKES for the period 2011-2014, decision Dnro 3081/31/2010, § 32.20.40.2.4/11). Партнер: Prof. Risto Myllylä, University of Oulu;

-Лазерная трансфекция клеток и тканей, меченных золотыми наноболочками (Laser induced transfection of cells/tissue mediated by gold nanoshells) Грант РФФИ и Королевского общества Великобритании 12-02-92610-КО_a, партнер: Prof. Kishen Dolakia, University of St. Andrews.

- Издание коллективной монографии – Valery V. Tuchin (Editor), Handbook of Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental Monitoring, and Materials Science, Springer, 2 тома, 32 главы, 1350 стр. Авторы из ведущих научных центров Европы, США, Канады, Австралии, Новой Зеландии, Китая, всего из 18 стран. Четыре главы подготовлены авторами проекта в результате совместных исследований с исследователями из Новой Зеландии, США и Китая. Глава 4 Diffusing Wave Spectroscopy: Application for Blood Diagnostics, Igor Meglinski and Valery V. Tuchin; Глава 5 Laser Speckle Imaging of Cerebral Blood Flow, Qingming Luo, Chao Jiang, Pengcheng Li, Haiying Cheng, Zhen Wang, Zheng Wang, and Valery V. Tuchin; Глава 13 Bioflow Measuring: Laser Doppler and Speckle Techniques, Ivan V. Fedosov and Valery V. Tuchin; Глава 16 Optical Coherence Tomography: Light Scattering and Imaging Enhancement, Ruikang K. Wang and Valery V. Tuchin. Книга сдана в печать и выйдет в январе 2013 года.

- Издание коллективной монографии: Valery Tuchin and Ricky Wang (Editors), Advanced Biophotonics: slicing tissue with photons, CRC Press, Taylor & Francis Book Inc., 17 глав, авторы из США, Канады, Китая, Новой Зеландии, Австралии и Европы. Проект завершается, прошла чистка корректуры).

- Издание монографии: В.В.Тучин, Оптика биологических тканей: Методы рассеяния света в медицинской диагностике, Физматлит, 2012 г., 50 а.л., Проект завершается, идет финальная чистка корректуры.

3) *Информация о том, сотрудничество с какими странами и исследовательскими центрами может способствовать наибольшей отдаче для развития в России технологий в области исследования, а также для выхода российской продукции на региональные и глобальные рынки.* США, университет Хьюстона; научный центр Бельгии; LG Electronics (Республика Корея); Институт прикладной физики, Италия (Istituto di Fisica Applicata "Nello Carrara"), Италия; University of St. Andrews, Великобритания; Университетская клиника Цюриха, Швейцария; Университетская клиника Шарите, Берлин, Германия; Университет Оулу, Финляндия; Olympus Inc., Япония; Palomar Medical Technologies Inc., США; Dental Photonics, США; BioRASi, США.

5. Опыт закрепления молодых исследователей – участников проекта (этапа проекта) в области науки, образования и высоких технологий

Закреплены следующие специалисты:

Петров Павел Олегович 21.02.1990 г. р. зачислен в очную аспирантуру Исполнителя;

*Тимошина Полина Александровна 29.06.1989 г. р. зачислена в очную аспирантуру
Исполнителя;*

*Тараканчикова Яна Владимировна 04.06.1990 г. р. зачислена в очную аспирантуру
Исполнителя;*

*Колесникова Екатерина Александровна 31.05.1990 г. р. зачислена в очную
аспирантуру Исполнителя;*

Ректор федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего профессионального
образования «Саратовский государственный университет
имени Н. Г. Чернышевского»

Коссович Л.Ю.

«_____» _____ 2012 г.

М.П.

Руководитель Проекта

Тучин В.В.