

УДК 543.424.2

НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА В КАЧЕСТВЕ ГКР-СУБСТРАТОВ ДЛЯ МТТ-ТЕСТА

© 2025 г. В. А. Мушенков^{1,*}, А. М. Буров², В. И. Кукушкин³, Е. Г. Завьялова¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Химический факультет, Москва, Россия

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», Саратов, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физики твердого тела имени Ю.А. Осипяна Российской академии наук, Черноголовка, Россия

*E-mail: vladimir.mushenkov@mail.ru

Поступила в редакцию 27.09.2024 г.

После доработки 18.10.2024 г.

Принята к публикации 28.10.2024 г.

Предложены несколько вариантов наночастиц золота для детекции формазана, образующегося в результате ферментативного восстановления МТТ-реактанта ферментами *E. coli*. Показано, что золотые нанозвезды, покрытые мицеллообразующим стабилизатором, являются наиболее перспективным ГКР-субстратом для детекции формазана в биологических смесях, снижая требуемый титр бактерий не менее чем на порядок.

Ключевые слова: гигантское комбинационное рассеяние, наночастицы, МТТ-тест, бактерия.

DOI: 10.31857/S0367676525020156, **EDN:** CWQXBX

ВВЕДЕНИЕ

Противомикробные препараты оказали огромное влияние на современную медицину. После широкого внедрения антибиотиков в медицинскую практику, смертность от инфекционных заболеваний, составлявшая более 50% от общей смертности, резко снизилась [1]. Антибиотики позволили излечивать тяжелые и прежде практически неизлечимые бактериальные заболевания, такие как туберкулез или холера. Профилактическое введение антибиотиков при совершении хирургических операций снижает риск возникновения инфекционных осложнений [2], повышая выживаемость пациентов.

Начало широкого использования антибиотиков быстро привело к распространению устойчивости к ним. Первые упоминания об устойчивых к пенициллину бактериях появились в 1940 г. [3], в начале эры антибиотиков, с тех пор антибиотикорезистентность стала одной из самых значимых проблем в медицине [4]. Устойчивость к антибактериальным препаратам прямо или косвенно ассоциирована с 4.95 млн смертей в 2019 г. [5]. По оценкам, к 2050 году устойчивые инфекции станут главной причиной смертности, вызывая до 10 млн смертей ежегодно и принеся суммарный ущерб экономике в 100 трлн долларов США [6].

Одна из трудностей при лечении устойчивой к антибиотикам инфекции – подбор правильной терапии, способной эффективно подавить размножение патогена. В медицинской практике часто применяют эмпирические схемы лечения, не основанные на данных об устойчивости конкретного патогена. Такие схемы позволяют незамедлительно начать лечение (в случае тяжелого течения заболевания отложенное начало терапии снижает вероятность благоприятного исхода на 57% [7]). Однако в случае резистентных заболеваний эмпирическая терапия может оказаться неэффективной [8], а в случае тяжелых состояний, таких как сепсис, неправильно подобранная терапия приводит к повышению смертности пациентов [9]. Одна из причин применения эмпирических методов терапии – длительность проведения анализов на резистентность. Так, классические культуральные методы (метод микроразведений, дискодиффузионный и т.д.) ограничены ростом колоний исследуемого штамма и в среднем занимают от 24 ч для получения результата [10]. Автоматизированные культуральные системы (Vitek и другие) позволяют ускорить анализ, но они остаются зависимыми от скорости роста бактерий [11]. Анализы на основе генетических (ПЦР [12]) или протеомных (масс-спектрометрия [13]) методов не зависят от

роста бактерий и позволяют получить результат за несколько часов. Однако ограничением таких методов является их узкая специфичность: методы основаны на анализе маркеров устойчивости (генов устойчивости, ферментов, расщепляющих антибиотики и т.д.), таким образом один метод чаще всего подходит для конкретного штамма и антибиотика и не подходит для других патогенов. К тому же, идентификация маркера не всегда является абсолютным показателем устойчивости патогена, что приводит к ложноположительным и ложноотрицательным результатам [14].

Измерение метаболической активности бактерий при помощи МТТ-теста

МТТ-тест – метод определения метаболической активности, основанный на ферментативном восстановлении тетразолиевых солей (чаще всего используется МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолбромид). Тетразолы восстанавливаются до соответствующих формазановых красителей. За восстановление тетразола в клетках отвечают ферменты класса NADH и NADPH – зависимых редуктаз, активность которых зависит от метаболизма клетки и концентрации свободного NAD(P)H [15]. МТТ-тест широко используется для определения метаболической активности как эукариот [16], так и прокариот, несмотря на то что механизм восстановления МТТ в последних изучен плохо [17]. МТТ-тест на бактериях используется для поиска новых антибиотиков [18], оценки образования биопленок [19, 20] и т.д. Для проведения анализа образец бактерий инкубируют с раствором МТТ, после чего образованный формазан обычно определяют спектрофотометрически, предварительно экстрагировав формазан органическим растворителем [17]. МТТ тест позволяет быстро измерять влияние антибиотика на бактерии по изменению их метаболической активности, при этом преимущество этого метода над другими быстрыми методами в его универсальности [21].

Использование спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света вместо спектрофотометрии для детекции формазана имеет ряд преимуществ. Спектроскопия КР или рамановская спектроскопия – спектроскопические методы исследования, основанные на неупругом рассеянии света на молекулах. Неупруго отраженный свет отличается по энергии от падающего за счет обмена энергией с молекулами, позволяя получить информацию о структуре молекул [22]. Спектроскопия КР позволяет идентифицировать молекулы и отдельные элементы их структуры по уникальным «отпечаткам пальцев», представленным в их рамановском спектре [23]. Возможность специфично детектировать целевые молекулы даже в сложных смесях нашла применение во многих областях исследования. Так, спек-

троскопия КР используется в криминалистике для детекции взрывчатых веществ или наркотиков [24,25], для контроля загрязнителей в сточных водах [26] и в продуктах питания [27]. В медицине спектроскопия КР используется для диагностики рака [28], нейродегенеративных заболеваний [29], атеросклероза [30] и т.д. Использование спектроскопии КР для детекции формазана в МТТ тесте позволит проводить измерение непосредственно в образце бактерий после добавления МТТ, без стадий экстракции формазана. Это упростит анализ и повысит его точность, так как при спектрофотометрическом методе анализа формазана в органической фазе результат может искажаться за счет выпадения белков и других поглощающих свет соединений [31]. Сравнительно низкая чувствительность спектроскопии комбинационного рассеяния может быть компенсирована усилением интенсивности сигнала в методе гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). ГКР позволяет многократно повысить чувствительность за счет поверхностного плазмонного резонанса на металлических наноструктурах (в основном наночастицах) [32]. Высокая чувствительность ГКР позволяет снизить время инкубации с МТТ, дополнительно ускоряя анализ [33].

Интенсивность и число характеристических полос спектров КР и ГКР зависят от частоты возбуждающего излучения, достигая максимума при значениях, близких к частоте электронного перехода исследуемого вещества [34]. Так, для МТТ оптимален лазер, излучающий в синей области спектра (325 нм), а для формазана – 637 нм. В данной работе проведен поиск ГКР-субстратов среди коллоидных наночастиц, подходящих для детекции формазана в бактериальных культурах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие реактивы: тригидрат тетрахлораурата водорода ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$); цитрат натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, хч); бромид цетилтриметиламмония (СТАВ, 98%); ацетатный буфер (ацетат натрия + уксусная кислота; pH = 4,6); тиолированный полиэтиленгликоль (5000 а.е.м., PEG-SH); боргидрид натрия (NaBH_4 , 99%); олеат натрия ($\text{NaC}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2$, 99%); нитрат серебра (AgNO_3 , 99%); концентрированная соляная кислота; хлорид цетилтриметиламмония (СТАС) 25% водный раствор; L-аскорбиновая кислота (АК, 99.9%); коллоидный золь золотых наночастиц средним размером 25 нм. PBS (pH 7.2) был приготовлен разведением одной таблетки (Экосервис, Санкт-Петербург, Россия) в 100 мл деионизированной воды. Тетразолиевый краситель МТТ («Диа-М», Москва, Россия) разводили до концентрации 4 мг/мл в воде и хранили при 4°С. Изопропанол (х.ч.) был приобретен у «Русхим» (Москва, Россия).

Среда LB (Lennox) была приобретена у Condalab (Мадрид, Испания).

Во всех экспериментальных синтезах использовалась сверхчистая деионизированная вода, полученная с помощью системы Milli-Q Integral 5. Спектры экстинкции измеряли на спектрофотометре Specord 300 (Analytik, Йена, Германия). Изображения, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), записывали на просвечивающем электронном микроскопе Libra-120 (Carl Zeiss, Йена, Германия) в Центре коллективного пользования исследовательского оборудования в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии (ЦКП «Симбиоз») Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН Саратовского научного центра РАН (ИБФРМ РАН).

Получение коллоидных золь золота (Au_sph)

В колбу наливали 98 мл воды и доводили до кипения с обратным водяным холодильником на магнитной мешалке. Добавляли 1 мл 1% раствора HAuCl_4 с последующим увеличением оборотов мешалки. Затем добавляли 1 мл 1% раствора цитрата натрия и продолжали кипячение в течении 30 мин. Получали золь наночастиц золота красного цвета. Первые 50 мл полученных наночастиц отмывали при 10000 об/мин и концентрировали в растворе 1 мМ СТАВ до оптической плотности 20 о.е., получая при этом частицы размером 43 нм с зарядом поверхности 45.4 мВ и положением максимума поглощения 533 нм. Ко вторым 50 мл наночастиц добавляли 500 мкл 1 мМ PEG-SH. Раствор выдерживали 1 ч, дважды отмывали водой при 10000 об/мин и концентрировали до 20 о.е., получали частицы размером 45 нм с зарядом поверхности -34.2 мВ и положением максимума поглощения 535 нм.

Для получения золотых СТАВ-стабилизированных кластеров в колбу наливали 10 мл 100 мМ СТАВ, при перемешивании на магнитной мешалке добавляли 250 мкл 10 мМ раствора HAuCl_4 . Увеличивали обороты и добавляли 600 мкл 10 мМ свежеприготовленного раствора борогидрида натрия. Перемешивание продолжали 2 мин и оставляли раствор при 300°C на 2 ч. Получали светло-коричневый раствор золотых СТАВ-стабилизированных кластеров, которые в дальнейшем использовали для получения золотых и золотосеребряных стержней.

Получение коллоидных золь золота (Au_rod)

В колбе растворяли 1.89 г СТАВ и 333.18 мг олеата натрия в 67.5 мл воды при перемешивании на магнитной мешалке. Затем добавляли без перемешивания 4.86 мл 4 мМ раствора нитрата серебра и выдерживали 15 мин. Далее добавляли 67.5 мл 1 мМ раствора HAuCl_4 и перемешивали 90 мин, при этом желтый раствор обесцвечивался.

Затем добавляли 567 мкл свежей концентрированной соляной кислоты с дальнейшим перемешиванием в течении 15 мин. После этого добавляли 216 мкл свежеприготовленных золотых СТАВ-стабилизированных кластеров. После 30 с перемешивания смесь оставляли при 30°C на 12 ч. Полученные золотые наностержни коричневого цвета отмывали 3 раза при 8000 об/мин и растворяли в 2 мМ СТАВ. Первые 50 мл полученных наночастиц доводили до оптической плотности 20 о.е., получая при этом частицы со средним диаметром 93 нм на 18 нм, средним осевым соотношением 5.2, зарядом поверхности 18.3 мВ и положением максимума поглощения 952 нм. Вторые 50 мл центрифугировали при 8000 об/мин и растворяли в 50 мл 50 мМ ацетатного буфера (pH 4.6) с добавлением 500 мкл 1 мМ PEG-SH. Раствор выдерживали 1 ч с последующей отмывкой водой и концентрированием до 20 о.е., получая частицы со средним диаметром 97 нм на 19 нм, осевым соотношением 5.1, зарядом поверхности -8.9 мВ и положением максимума поглощения 955 нм. Оставшуюся третью часть полученных наночастиц перевели в 2 мМ СТАС и использовали для получения золотосеребряных наностержней.

Получение коллоидных золь золота (Au_rod_Ag)

В колбу, содержащую 75 мл 20 мМ раствора СТАС, добавляли 25 мл наностержней (955 нм) полученных ранее, затем 3.2 мл 10 мМ аскорбиновой кислоты и 800 мкл 10 мМ нитрата серебра. После небольшого перемешивания колбу оставляли при 70°C на 4 ч. Первые 50 мл наночастиц центрифугировали при 7000 об/мин и концентрировали до 20 о.е. в 2 мМ СТАС. Получали наночастицы среднего диаметра 109 нм на 45 нм, зарядом поверхности 19.3 мВ и положением максимума поглощения 710 нм. Вторые 50 мл наночастиц растворяли при 7000 об/мин в 50 мл 50 мМ ацетатного буфера (pH 4.6) с добавлением 500 мкл 1 мМ PEG-SH. Раствор выдерживали 1 ч с последующей отмывкой водой и концентрированием до 20 о.е., получая при этом частицы со средним диаметром 112 нм на 45 нм, зарядом поверхности -9 мВ и положением максимума поглощения 711 нм.

Получение коллоидных золь золота (Au_star)

В колбу наливали 100 мл деионизированной воды, затем по очереди добавляли 2.5 мл 1% HAuCl_4 , далее 300 мкл 1 М соляной кислоты, 8 мл коллоидного золь золотых наночастиц средним размером 25 нм, и добавляли по 1.5 мл 4 мМ нитрата серебра и 100 мМ аскорбиновой кислоты. Перемешивали 30 с и получали раствор золотых нанозвезд синего цвета. Первые 50 мл нанозвезд центрифугировали при 5000 об/мин, концентрировали до 20 о.е. Растворением в 1 мМ СТАВ, получали частицы со средним размером 43 нм (ядро

звезды) и 55 нм (длина шипа звезды), зарядом поверхности 37.7 мВ и максимумом поглощения 738 нм. Ко вторым 50 мл наночастиц добавляли 500 мкл 1 мМ PEG-SH, выдерживали 1 ч, центрифугировали при 5000 об/мин и концентрировали до 20 о.е. с растворением в воде. Получали нанозвезды со средним размером 45 нм (ядро звезды) и 57 нм (длина шипа звезды), зарядом поверхности – 14.8 мВ и максимумом поглощения 760 нм.

Для приготовления рабочего раствора концентрированные наночастицы перемешивали в течение 2 мин и разбавляли водой в 10 раз.

Подготовка клеток E. coli

Штамм *Escherichia coli* ΔtolC-KanR (JW5503) с удаленной кассетой устойчивости к канамицину был получен от Д.А. Лукьянова (лаборатория О.А. Донцовой, химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова). Жидкую среду LB готовили из бульона LB (Lennox) в соответствии с инструкцией производителя. 4 г твердой среды ресуспендировали в 200 мл воды MilliQ, перемешивали и стерилизовали в автоклаве в течение 15 мин при температуре 121°C. Приготовленную среду хранили при температуре 4°C. Штаммы бактерий помещали в чашку с агаром при температуре 37°C; затем в течение ночи выращивали одиночную колонию в среде LB при температуре 37°C. Ночную культуру клеток *E. coli* разбавляли средой LB до требуемых концентраций (концентрации измеряли по оптической плотности при длине волны 600 нм), после чего инкубировали при 37°C в течение 60 мин.

Пробоподготовка формазана

Ночную культуру клеток *Escherichia coli* (1 мл) обрабатывали 200 мкл раствора МТТ и инкубировали 1 ч при 37°C, после чего клеточную суспензию центрифугировали при 12400 g в течение 1 мин. К осадку добавили 2 мл изопропилового спирта, тщательно перемешали и центрифугировали в тех же условиях. Супернатант отбирали и разбавляли в два раза изопропанолом. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 570 нм и доводили до концентрации 0.1 г/л, используя коэффициент экстинкции из работы [35].

Пробоподготовка для измерения рамановских спектров

Определение чувствительности определения формазана проводили следующим образом. Смесь раствора формазана (концентрации варьировали) и PBS конечным объемом 200 мкл переносили в кювету, добавляли 300 мкл раствора наночастиц золота, перемешивали и проводили измерение. Исследование формазана, восстановленного бактериальными ферментами, проводили следующим образом. К 50 мкл подготовленных культур клеток добавляли 350 мкл

PBS и 100 мкл МТТ. Инкубировали 30 мин при 37°C. Затем в вialsу перенесли 200 мкл раствора, добавили 100 мкл изопропанола и 300 мкл наночастиц, перемешивали, затем после инкубации в течение 2 минут проводили измерение.

Спектральные измерения

Оптическую плотность и спектры поглощения измеряли на спектрофотометре ЭКРОС 5400УФ («Экрос», Россия). Спектры поглощения наночастиц измеряли в кюветах с оптическим путем 1 мм в диапазоне от 300 до 800 нм. Для получения спектров ГКР использовался спектрометр Фотон-Био RL638 («Фотон-Био», Москва, Россия) с длиной волны лазера 638 нм и мощностью излучения 100 мВт. Параметры измерения: экспозиция 400 мс, 20 повторов, мощность лазера (ШИМ) 70%. Измерения проводили в стеклянных виалах с рабочим объемом 500 мкл. Спектры обрабатывали скриптом на Python3 алгоритмами Уиттакера [36] и асимметричного взвешенного сглаживания по методу наименьших квадратов [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор и синтез наночастиц для определения формазана

Формазан – резонансный краситель для длины волны лазера 633 нм Рамановского спектрометра. Использование этого лазера предпочтительно по сравнению с лазерами 532 и 785 нм, давая кратно большие интенсивности Рамановского спектра формазана [33]. Выбор наночастиц был проведен с учетом этого обстоятельства. Наночастицы золота являются прекрасными кандидатами на роль ГКР-субстратов по множеству причин. Морфологические особенности наночастиц, их размерный ряд и положение максимумов плазмонных резонансов являются легко настраиваемыми параметрами и позволяют получить частицы с заданными геометрическими и спектральными свойствами. Кроме того, поверхность таких частиц достаточно легко подвергается сложной модификации путем функционализации различными органическими лигандами, что помогает колоссально расширить возможности применения получаемых композитных наночастиц в разнообразных областях науки и техники [38, 39]. Также стоит упомянуть, что их растворы имеют достаточно высокую коллоидную стабильность, что немаловажно в различных биологических экспериментах.

В нашей работе выбор наночастиц был продиктован необходимостью получения нанометок с высоким фактором усиления рамановского сигнала. Для решения этой задачи нами были выбраны четыре претендента с пиками плазмонного резонанса в широком диапазоне поглощения: наночастицы золота полученные цитратным мето-

дом (Au_sph) на 533–535 нм, золотые наностержни (Au_rod) на 952–955 нм; золото-серебряные наностержни (Au_rod_Ag) на 710–711 нм; и золотые нанозвезды (Au_star) с пиком плазмонного резонанса в области 738–760 нм (рис. 1, табл. 1). Au_sph являются одними из самых распространенных видов частиц, используемых в различных областях сенсинга. Au_rod и Au_star обладают высоким фактором усиления рамановского сигнала в ближней инфракрасной области, что также применимо для частиц Au_rod_Ag, где роль усиливающего фактора играет серебряная оболочка. Кроме того, все четыре типа наночастиц были получены как с положительным, так и отрицательным зарядом поверхности (табл. 1) за

счет использования мицеллообразующего (СТАС или СТАВ) или полимерного (PEG) стабилизаторов.

Определение формазана с использованием наночастиц

Синтезированные наночастицы были использованы для получения спектра формазана. Сравнительные эксперименты были проведены при конечной концентрации формазана 1 мкг/мл (2.4 мкМ), когда в отсутствие усиливающего субстрата детектирование спектра формазана затруднительно. Очищенный формазан смешивали с 200 мкл наночастиц и 300 мкл буфера PBS. Несколько полученных спектров приведено на

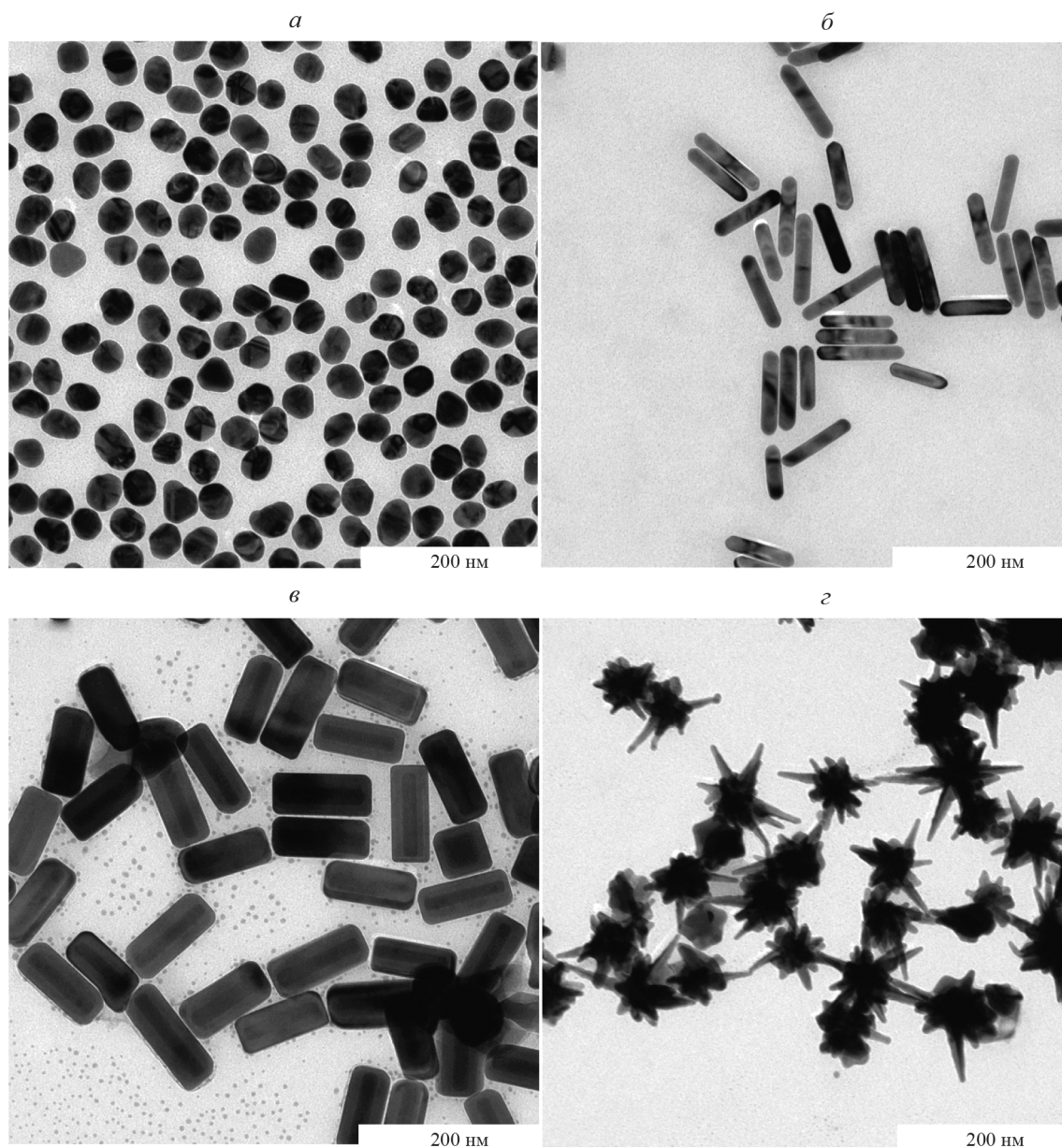


Рис. 1. Просвечивающая электронная микроскопия наночастиц золота, стабилизированных мицеллообразующим стабилизатором: Au_sph_СТАВ (а), Au_rod_СТАВ (б), Au_rod_Ag_СТАС (в) и Au_star_СТАВ (г).

Таблица 1. Морфология и свойства исследуемых наночастиц. Приведены средние размеры наночастиц, длина волны плазмонного резонанса и ζ -потенциал.

Шифр	Описание	Размер (нм)	Длина волны плазмонного резонанса (нм)	ζ -потенциал (мВ)
Au_sph_СТАВ	Коллоидные золотые наночастицы, покрытые СТАВ	43 (диаметр)	533	45.4
Au_sph_PEG	Коллоидные золотые наночастицы, покрытые PEG	45 (диаметр)	535	-34.2
Au_rod_СТАВ	Золотые наностержни, покрытые СТАВ	93 (длина), 18 (ширина)	952	18.3
Au_rod_PEG	Золотые наностержни, покрытые PEG	97 (длина), 19 (ширина)	955	-8.9
Au_rod_Ag_СТАС	Золотые наностержни в серебряной оболочке, покрытые СТАС	109 (длина), 45 (ширина)	710	19.3
Au_rod_Ag_PEG	Золотые наностержни в серебряной оболочке, покрытые PEG	112 (длина), 45 (ширина)	711	-9
Au_star_СТАВ	Золотые нанозвезды, покрытые СТАВ	43 нм (ядро), 55 нм (длина шипов)	738	37.7
Au_star_PEG	Золотые нанозвезды, покрытые PEG	45 нм (ядро), 57 нм (длина шипов)	760	-14.8

Таблица 2. Интенсивность спектра формазана в присутствии разных типов наночастиц. Конечная концентрация формазана 1 мкг/мл, измеряли интенсивность пика формазана при 967 см^{-1} . Контроль агрегации наночастиц проверяли по изменению спектров поглощения наночастиц.

Тип НЧ	Агрегация	Снижение поглощения в максимуме поглощения	Интенсивность пика при 967 см^{-1} , отн. ед.
Au_sph_СТАВ	есть	$1.9 \times$	18320
Au_sph_PEG	нет	—	57
Au_rod_СТАВ	есть	$2.0 \times$	220
Au_rod_PEG	нет	—	16
Au_rod_Ag_СТАС	есть	$2.0 \times$	11890
Au_rod_Ag_PEG	нет	—	63
Au_star_СТАВ	есть	$2.4 \times$	8610
Au_star_PEG	нет	—	19

рис. 2, а сравнение интенсивностей одной из характерных полос формазана — в табл. 2. Оказалось, что несколько видов наночастиц дают интенсивные спектры формазана (Au_sph_СТАВ,

Таблица 3. Интенсивность спектра формазана, образовавшегося в результате химического катализа реакции МТТ → формазан в присутствии разных типов наночастиц. Конечная концентрация МТТ-реагента 0.8 мкг/мл; измеряли интенсивность пика формазана при 967 см⁻¹.

Тип наночастиц	Интенсивность пика при 967 см ⁻¹ , отн. ед.
Au_sph_СТАВ	20
Au_rod_Ag_СТАВ	20440
Au_star_СТАВ	0

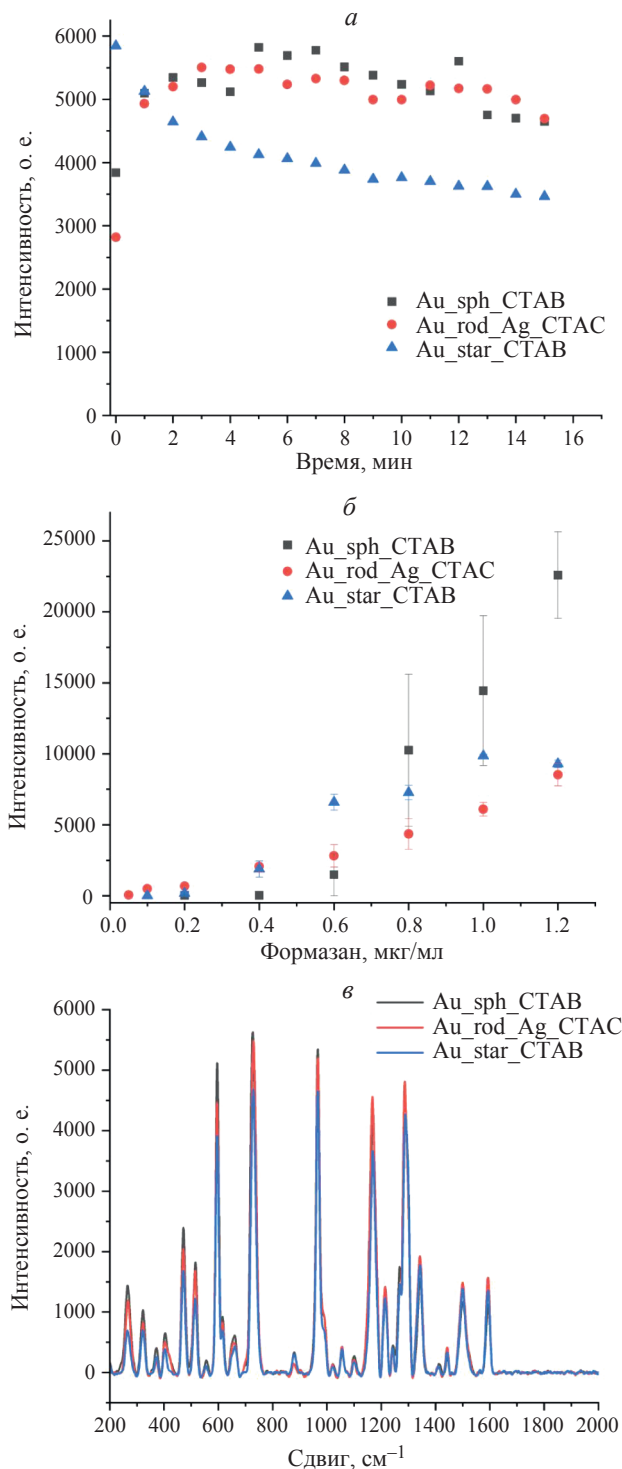


Рис. 2. Зависимость интенсивности рамановского спектра формазана от времени инкубации (а) и концентрации формазана (б) в присутствии наночастиц Au_sph_СТАВ, Au_rod_Ag_СТАВ и Au_star_СТАВ. Общий вид спектров приведен во вставке (е).

Au_rod_Ag_СТАВ) и Au_star_СТАВ), в то время как остальные наночастицы значительно менее эффективны для получения спектра формазана в низких концентрациях. Общей характеристикой для наночастиц с наиболее интенсивными спектрами формазана является использование мицеллообразующего стабилизатора (СТАВ или СТАС), а не полимера (PEG). Для объяснения этого феномена была оценена агрегация наночастиц по уменьшению пика поглощения в видимом спектре (положения максимумов поглощения приведены в табл. 1). Оказалось, что все варианты наночастиц мицеллообразующим стабилизатором (СТАВ или СТАС) агрегируют с падением интенсивности поглощения примерно в 2 раза (табл. 2), в то время как PEG сохраняет наночастицы в неагрегированном состоянии. Таким образом, агрегация наночастиц — ключевой параметр, который определяет возможности детекции формазана в низких концентрациях.

Дополнительно была оценена стабильность интенсивности Рамановского спектра формазана в зависимости от времени инкубации с наночастицами (рис. 2а). Интенсивность спектра в присутствии Au_sph_СТАВ и Au_rod_Ag_СТАВ незначительно изменялась во времени. В то время как Au_star_СТАВ показывают небольшое снижение сигнала во времени. Таким образом, измерение спектров имеет смысл делать примерно через 1–2 мин после смешения, без длительных инкубаций.

Для трех типов наночастиц (Au_sph_СТАВ, Au_rod_Ag_СТАВ и Au_star_СТАВ) определили предел обнаружения (LoD) формазана (рис. 2б). LoD оценили по формуле $LoD = I_{фон} + 3.3 \cdot SD_{фон}$. LoD оказался минимальным для наночастиц Au_rod_Ag_СТАВ (0.05 мкг/мл), в то время как LoD для Au_sph_СТАВ составил 0.41 мкг/мл, а для Au_star_СТАВ — 0.12 мкг/мл. Наночастицы Au_rod_Ag_СТАВ позволяют определять формазан при более низких концентрациях, в то время как Au_sph_СТАВ и Au_star_СТАВ несколько уступают по пределу обнаружения формазана.

Применимость наночастиц для определения формазана в бактериальных клетках

Ранее мы обнаружили, что некоторые ГКР-субстраты способны восстанавливать МТТ-реагент с образованием формазана в отсутствие ферментов и живых организмов. Три типа наночастиц (Au_sph_СТАВ, Au_rod_Ag_СТАС и Au_star_СТАВ) были смешаны с МТТ-реагентом, чтобы исключить это затрудняющее обстоятельство. Оказалось, что наночастицы с серебряным покрытием, Au_rod_Ag_СТАС, выступают катализаторами восстановления МТТ-реагента, приводя к появлению спектра формазана без энзимологического катализа за считанные минуты. В то же время, Au_sph_СТАВ и Au_star_СТАВ не дают характерный спектр формазана (табл. 3). Таким образом, данный наночастицы Au_rod_Ag_СТАС не подходят для измерений спектров формазана в живых клетках, поскольку разделение вкладов химического и энзимологического катализа невозможно.

Наночастицы Au_sph_СТАВ и Au_star_СТАВ были исследованы для определения формазана в клетках *E. coli*. Клетки *E. coli* инкубировали с МТТ-реагентом в буфере PBS в течение 30 мин. Далее к клеткам добавляли 50 об. % изопропанола, далее к этой смеси добавляли эквивалентный объем раствора наночастиц. Изопропанол необходим для лизиса клеток и растворения кристаллов формазана, увеличивая доступность формазана для детекции наночастицами [40]. В данной постановке опыта наночастицы Au_star_СТАВ давали 5–10-кратно большую интенсивность спектра формазана в сравнении с Au_sph_СТАВ (табл. 4, рис. 3). Наблюдаемые отличия могут быть связаны с тушением рамановского спектра за счет сорбции биологических макромолекул на гладкой поверхности сфер, которые снижают эффект агрегации. Напротив, нанозвезды позволяют получить высокую интенсивность полос формазана в образ-

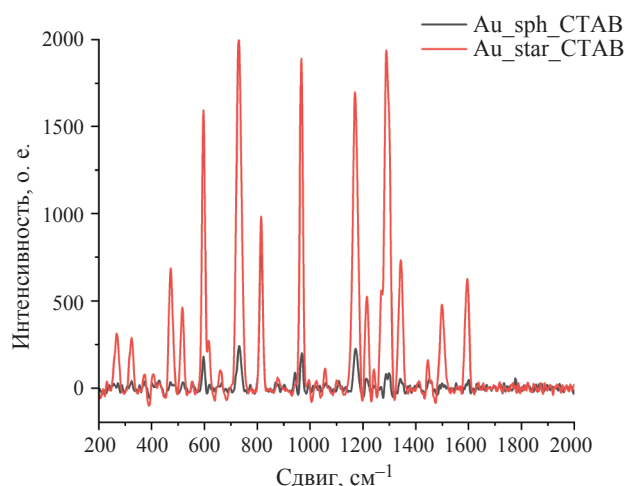


Рис. 3. Рамановские спектры, полученные для клеток *E. coli*, обработанных МТТ-реагентом, с использованием наночастиц Au_sph_СТАВ и Au_star_СТАВ. Линии спектра совпадают с линиями формазана.

цах бактерий. В данной работе были проверены титры бактерий 10^5 – 10^7 КОЕ/мл. Оба типа наночастиц, Au_sph_СТАВ и Au_star_СТАВ, позволили определить формазан, продуцируемый титрами бактерий в указанном диапазоне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами были предложены несколько вариантов наночастиц золота для детекции формазана, образующегося в результате энзиматического восстановления МТТ-реагента ферментами *E. coli*. Спектр очищенного формазана был успешно получен на 4 типах золотых наночастиц. Однако при переходе к бактериальным культурам спектр формазана оказалось возможным получить только на сферических наночастицах золота и золотых нанозвездах, стабилизированных СТАВ. Золотые наночастицы с серебряным покрытием восстанавливали МТТ-реагент в отсутствие бактерий, что делает

Таблица 4. Интенсивность спектра формазана, образовавшегося в результате энзиматического катализа реакции МТТ → формазан ферментами клеток *E. coli* в присутствии разных типов наночастиц. Конечная концентрация МТТ-реагента 0,8 мкг/мл; измеряли интенсивность пика формазана при 967 см^{-1} .

Тип наночастиц	Концентрация клеток <i>E. coli</i> (КОЕ/мл)	Интенсивность пика при 967 см^{-1} , отн. ед.
Au_sph_СТАВ	0	20
	10^5	110 ± 5
	10^6	180 ± 7
	10^7	150 ± 50
Au_star_СТАВ	0	0
	10^5	1100 ± 80
	10^6	800 ± 160
	10^7	1600 ± 400

их непригодными для анализа бактериальных культур. Золотые нанозвезды давали наиболее интенсивный ГКР-сигнал, что делает их перспективным ГКР-субстратом для детекции формазана в биологических смесях.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-65-00015, <https://rscf.ru/project/24-65-00015>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cook M.A., Wright G.D. // *Sci. Transl. Med.* 2020. V. 14. No. 657. Art. No. eabo7793.
2. Prospero E., Barbadoro P., Marigliano A. et al. // *Epidemiol. Infect.* 2011. V. 139. No. 9. P. 1326.
3. Davies J., Davies D. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010. V. 74. No. 3. P. 417.
4. Walsh T.R., Gales A.C., Laxminarayan R. et al. // *PLoS Med.* 2023. V. 20. No. 7. Art. No. e1004264.
5. Kim C., Holm M., Frost I. et al. // *BMJ Glob Health.* 2023. V. 8. No. 7. Art. No. e011341. <https://apo.org.au/node/63983>.
6. Zasowski E.J., Bassetti M., Blasi F. et al. // *Chest.* 2020. V. 158. No. 3. P. 929.
7. Autore G., Neglia C., Di Costanzo M. et al. // *Children.* 2022. V. 9. No. 2. P. 128.
8. Garnacho-Montero J., Ortiz-Leyba C., Herrera-Melero I. et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2008. V. 61. No. 2. P. 436.
9. Syal K., Mo M., Yu H. et al. // *Theranostics.* 2017. V. 7. No. 7. P. 1795.
10. Puttaswamy S., Gupta S.K., Regunath H. et al. // *Arch. Clin. Microbiol.* 2018. V. 9. No. 3. P. 83.
11. Steingart K.R., Sohn H., Schiller I. et al. // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014. V. 2014. No. 1. Art. No. CD009593.
12. Burckhardt I., Zimmermann S. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1744.
13. Khan Z.A., Siddiqui M.F., Park S. // *Diagnostics.* 2019. V. 9. No. 2. P. 49.
14. Berridge M.V., Herst P.M., Tan A.S. // *Biotechnol. Annu. Rev.* 2005. V. 11. P. 127.
15. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. // *Cold Spring Harb Protoc.* 2018. V. 2018. No. 6. Art. No. pdb-prot095505.
16. Grela E., Kozłowska J., Grabowiecka A. // *Acta Histochem.* 2018. V. 120. No. 4. P. 303.
17. Shi L., Ge H.-M., Tan S.-H. et al. // *Eur. J. Med. Chem.* 2007. V. 42. No. 4. P. 558.
18. Nuryastuti T., van der Mei H.C., Busscher H.J. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. No. 21. P. 6850.
19. Schillaci D., Arizza V., Dayton T. et al. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2008. V. 47. No. 5. P. 433.
20. Grela E., Kozłowska J., Grabowiecka A. // *Acta Histochem.* 2018. V. 120. No. 4. P. 303.
21. <https://www.edmundoptics.com/knowledge-center/application-notes/lasers/basic-principles-of-raman-scattering-and-spectroscopy/>.
22. Das R.S., Agrawal Y.K. // *Vibr. Spectrosc.* 2011. V. 57. No. 2. P. 163.
23. Harvey S.D., Vucelick M.E., Lee R.N. et al. // *Forensic. Sci. Int.* 2002. V. 125. No. 1. P. 12.
24. Hodges C.M., Akhavan J. // *Spectrochim. Acta A.* 1990. V. 46. No. 2. P. 303.
25. Ianoul A., Coleman T., Asher S.A. // *Analyt. Chem.* 2002. V. 74. No. 6. P. 1458.
26. Yang D., Ying Y. // *Appl. Spectrosc. Rev.* 2011. V. 46. No. 7. P. 539.
27. Depciuch J., Kaznowska E., Zawlik I. et al. // *Appl. Spectrosc.* 2016. V. 70. No. 2. P. 251.
28. Devitt G., Howard K., Mudher A. et al. // *ACS Chem. Neurosci.* 2018. V. 9. No. 3. P. 404.
29. MacRitchie N., Grassia G., Noonan J. et al. // *Heart.* 2018. V. 104. No. 6. P. 460.
30. <https://www.promega.com.br/resources/pubhub/is-your-mtt-assay-really-the-best-choice>.
31. Hering K., Cialla D., Ackermann K. et al. // *Analyt. Bioanal. Chem.* 2008. V. 390. P. 113.
32. Mao Z., Liu Z., Chen L. et al. // *Analyt. Chem.* 2013. V. 85. No. 15. P. 7361.
33. Robert B. // *Photosynth. Res.* 2009. V. 101. P. 147.
34. Gerlier D., Thomasset N. // *J. Immunol. Meth.* 1986. V. 94. No. 1–2. P. 57.
35. Eilers P.H.C. // *Analyt. Chem.* 2003. V. 75. No. 14. P. 3631.
36. Baek S.-J., Park A., Ahn Y.-J. et al. // *Analyst.* 2015. V. 140. No. 1. P. 250.
37. Грибанев Д.А., Рудакова Е.В., Завьялова Е.Г. // *Изв. РАН. Сер. физ.* 2023. Т. 87. № 2. С. 194; Gribanov D.A., Rudakova E.V., Zavyalova E.G. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2023. V. 87. No. 2. P. 165.
38. Жданов Г.А., Грибанев Д.А., Гамбарян А.С. и др. // *Изв. РАН. Сер. физ.* 2022. Т. 86. № 4. С. 531; Zhdanov G.A., Gribanov D.A., Gambaryan A.S. et al. // *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 2022. V. 86. No. 4. P. 434.
39. Мушенков В.А., Лукьянов Д.А., Мещерякова Н.Ф. и др. // *Молек. биол.* 2024. Т. 58. № 6. С. 1031.

Gold nanoparticles as SERS-substrates for MTT assay

V. A. Mushenkov^{a,*}, A. M. Burov^b, V. I. Kukushkin^c, E. G. Zavyalova^a

^aDepartment of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

^bInstitute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia

^cOsipyan Institute of Solid-State Physics of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 142432 Russia

*e-mail: vladimir.mushenkov@mail.ru

Several variants of gold nanoparticles were proposed for the detection of formazan formed because of enzymatic reduction of the MTT reagent by *E. coli* enzymes. It is shown that gold nanostars coated with a micellar stabilizer are the most promising SERS-substrate for the detection of formazan in biological mixtures, reducing the required titer of bacteria by at least an order of magnitude.

Keywords: surface-enhanced Raman scattering, nanoparticles, MTT assay, bacteria.