



Формирование стабильной крестообразной сборки наночастиц золота из листьев конопли индийской

Анджул Хадрия 1,2* и Субханкар Пол 1*

- ¹ Лаборатория структурной биологии и наномедицины, факультет биотехнологии и медицинской инженерии, Национальный технологический институт, Руркела 769008, Индия
² Лаборатория оптической визуализации Калифорнийского технологического института, Эндрю и Пегги Чернг, Департамент медицинской инженерии, Калифорнийский технологический институт, Пасадена, Калифорния 91125, США * Переписка : anjul@caltech.edu (AK); spaul@nitrrkl.ac.in (Испания)

Аннотация: Наночастицы золота все чаще используются в электронике, производстве материалов и биомедицинских приложениях. Сообщается о нескольких методах получения наночастиц золота различной формы и размера с разными фотофизическими свойствами. Несмотря на полезность получения наночастиц золота, большинство методов недостаточно стабильны, что приводит к деградации наночастиц, если их хранить при комнатной температуре (до 30 °C) в течение нескольких дней. В этой статье мы сообщаем о новом и экологически чистом методе синтеза самоорганизующихся наночастиц золота крестообразной формы с использованием экстракта листьев *Cannabis indica* в качестве восстановителя без помощи каких-либо полимеров или дополнительных химикатов. Установлено, что наночастицы стабильны более месяца (45 дней) при хранении при комнатной температуре (до 30 °C). Им удалось сформировать стабильные конъюгаты с бычьим белком α -лактальбумином, которые могут обладать противораковыми свойствами.

Ключевые слова: наночастицы золота; наноматериалы; белок альфа-лактальбумин; Каннабис Индика



Цитирование: Хадрия А.; Пол, С.

Формирование стабильной крестообразной формы

Сборка наночастиц золота из листьев конопли индийской. Прил.

Нано 2022, 3, 143–148. <https://doi.org/10.3390/applnano3030010>

Академический редактор: Энтони Уильям Коулман

Поступила: 9 июня 2022 г.

Принято: 7 июля 2022 г.

Опубликовано: 13 июля 2022 г.

Примечание издателя: MDPI сохраняет нейтралитет в отношении заявлений о юрисдикции в опубликованных картах и институциональной принадлежности.



Копирайт: © 2022 авторов.

Лицензиат MDPI, Базель, Швейцария.

Эта статья находится в открытом доступе. распространяется на условиях и условия Creative Commons

Лицензия с указанием авторства (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Введение

Использование наночастиц золота в ряде биомедицинских и небимедицинских приложений возросло в геометрической прогрессии [1]. Несколько исследований показали, что наночастицы золота обладают противораковой активностью, а недавно было клинически показано, что они способны лечить локализованные опухоли простаты [2]. Благодаря своим превосходным фотофизическим свойствам они были исследованы для использования в качестве тераностических агентов [3]. Наночастицы золота стали одним из наиболее многообещающих средств для лечения различных типов рака благодаря нескольким связанным с ними преимуществам, таким как (1) легкость клеточного поглощения путем эндоцитоза, (2) простота крупномасштабного синтеза и характеристики, (3) способность образовывать стабильные комплексы с широким спектром биомолекул, (4) биосовместимость и (5) уникальные физико-химические свойства. Наночастицы золота разной формы и размера обладают разными уникальными свойствами и по-разному воздействуют на раковые клетки [4]. Было успешно показано, что конъюгаты белка бычьего альфа-лактальбумина (BLA) с олеиновой кислотой, широко известные как BAMLET (бычий альфа-лактальбумин, смертельный для опухолей), являются противораковыми; однако олеиновая кислота токсична и для здоровых клеток [5,6]. Было показано, что биосовместимые наночастицы золота заменяют олеиновую кислоту в конъюгате BAMLET с образованием противораковых конъюгатов наночастиц золота с BLA *in vivo* [7]. Одной из важных задач синтеза собранных наночастиц золота является обеспечение их стабильности при температуре до 30 °C, что обеспечит им длительный срок хранения и сделает их биосовместимыми. Некоторые методологии синтеза наночастиц требуют высоких температур и токсичных химикатов, которые могут быть вредными для белков. В этом исследовании мы сообщаем о синтезе стабильных, крестообразно собранных наночастиц золота с использованием листьев *Cannabis indica* и образовании его конъюгатов с белком BLA. Обычно собранные наночастицы золота готовят с помощью полимеров или других тиоловых химикатов; однако в этом о

мы не использовали какие-либо синтетические химикаты для формирования крестообразной сборки наночастиц золота [1,9].

2. Материалы и методы

Материалы: Цетилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) был получен от Himedia, Индия. Олеиновую кислоту получали от RFCL Limited, Индия. Гидрат хлорида золота и бычий α -лактальбумин (BLA) были получены от Sigma Aldrich, Индия. Вся стеклянная посуда была куплена в компании Borosil, Индия. Во всех препаратах использовали воду Milli-Q (класс ВЭЖХ).

Синтез крестообразной сборки наночастиц золота с использованием экстракта листьев *Cannabis indica*: Для приготовления восстановителя листа *Cannabis indica* (2,80 г) растворяли в 5 мл воды с последующим центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант фильтровали с использованием шприцевого фильтра с размером пор 0,22 мкм (Whatman) и осадок выбрасывали. Раствор хлорида золота (5 мл, 2,5 мМ) в воде смешивали с 18,65 мл 12,5 мМ водного раствора цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ) и смесь перемешивали при 100 °C. Через 2 минуты к реакционной смеси добавляли отфильтрованный экстракт листьев (супернатант). Реакцию гасили, помещая колбу с реакционной смесью в ледяную баню вскоре после того, как цвет смеси становился розовато-красным, что является характерным цветом наночастиц золота.

Анализ размера частиц методом динамического светорассеяния (DLS): Анализ размера частиц DLS проводили для определения среднего размера и индекса полидисперсности наночастиц с использованием прибора Malvern Zetasizer Nano-ZS.

Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) и энергодисперсионный рентгеновский анализ (EDX): СЭМ-изображение высокого разрешения было получено с помощью прибора Jeol JSM-6480 LV. На сетке для визуализации были приготовлены тонкие пленки образца. EDX-анализ проводился прибором JEOL-JSM 5800 для подтверждения наличия золота.

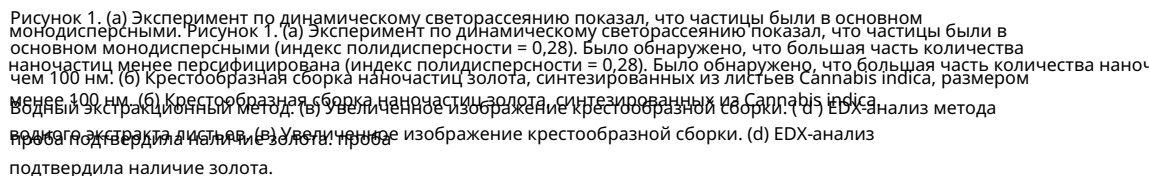
Анализ спектров УФ-Вид ВНП: Спектроскопический анализ УФ-Вид (PerkinElmer, Lambda35) реакционной смеси проводился при длинах волн 400–700 нм для проверки стабильности наночастиц. Наночастицы хранили при комнатной температуре (до 30 °C) в темноте между измерениями.

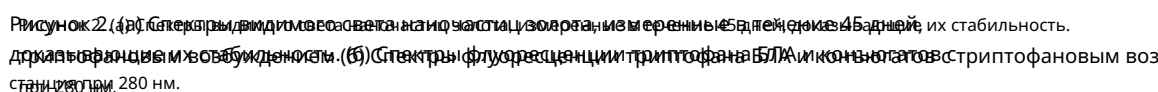
Приготовление конъюгатов BAMLET и GNP-BLA. Исходный раствор бычьего α -лактальбумина (BLA) готовили в 20 мМ фосфатном буфере с pH 7,2. Для приготовления конъюгатов суспензию наночастиц золота (0,35 мл) смешивали с 0,15 мл раствора BLA до конечной концентрации BLA 1,0 мг/мл и ЗНЧ 1,75 мМ с последующей инкубацией при 60 °C в течение 10 мин. Для приготовления БАМЛЕТ 10 мкл олеиновой кислоты смешивали с 0,3 мл исходного раствора БЛА (конечная концентрация 1 мг/мл) и 0,69 мл буфера и инкубировали при 60 °C в течение 10 мин [10].

Спектры флуоресценции триптофана. Раствор бычьего белка α -лактальбумина (BLA) готовили в 20 мМ фосфатном буфере (pH = 7,2) в концентрации 1 мг/мл. Спектры флуоресценции триптофана конъюгатов ЗНЧ-БЛА и только раствора БЛА регистрировали на люминесцентном спектрометре Perkin-Elmer LS-55. Использовалась длина волны возбуждения 280 нм, а спектры излучения записывались в диапазоне от 280 до 5

3. Результаты

Наночастицы золота обычно получают методом химического восстановления [11]. Различные растительные экстракты, такие как *Hibiscus rosa-sinensis* и *Ocimum tenuiflorum*, использовались в качестве восстановителей для синтеза наночастиц золота из хлорида золота [12,13]. Здесь мы синтезировали стабильную крестообразную сборку наночастиц золота, используя водный экстракт листьев растений *Cannabis indica*. С помощью динамического рассеяния света мы подтвердили, что частицы, полученные нашим методом, были монодисперсными (индекс полидисперсности 0,28) и наноразмерными (рис. 1а). Размеры и форма наночастиц были подтверждены экспериментами с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 1б,с). Эксперименты с помощью СЭМ выявили редкую крестообразную сборку наночастиц. Анализ EDX (рис. 1d) подтвердил наличие золота в образце.

[illegible]

[illegible]

Использование водного экстракта листьев *Cannabis indica* в качестве восстановителя обеспечивает отсутствие токсичных отходов во время процедуры синтеза, в отличие от использования вредных веществ. Это открытие дает представление о новом классе соединений, которые можно использовать для синтеза наночастиц золота. На основе полученных данных можно предположить, что наночастицы золота, синтезированные в водном экстракте листьев *Cannabis indica*, могут быть использованы для синтеза стабильных (при температуре до 30 °C) самоорганизующихся наночастиц золота. Изучая спектры флуоресценции, мы обнаружили красное смещение, а также уменьшение флуоресценции триптофана, что указывает на конформационную конформацию. Снижение реактивности флуоресценции триптофана белка BLA, что свидетельствует об изменении белка. Конформационные изменения белка BLA в результате конъюгации, по-видимому, являются результатом взаимодействия с наночастицами золота. Изменение сводится к тому, что наночастицы золота, синтезированные в водном экстракте листьев *Cannabis indica*, могут использоваться для синтеза наночастиц золота, обладающих свойствами гидрофобного ядра и гидрофильной оболочки. Это открытие имеет большое значение, поскольку различные типы самоорганизующихся наночастиц золота с уникальными свойствами могут быть использованы для синтеза наночастиц золота, обладающих свойствами гидрофобного ядра и гидрофильной оболочки. Это открытие имеет большое значение, поскольку различные типы самоорганизующихся наночастиц золота с уникальными свойствами могут быть использованы для синтеза наночастиц золота, обладающих свойствами гидрофобного ядра и гидрофильной оболочки. Это открытие имеет большое значение, поскольку различные типы самоорганизующихся наночастиц золота с уникальными свойствами могут быть использованы для синтеза наночастиц золота, обладающих свойствами гидрофобного ядра и гидрофильной оболочки.

и физико-химические свойства могут быть сначала синтезированы; затем могут быть образованы их конъюгаты с белком BLA. В клинических испытаниях, в которых использовались наночастицы золота для лечения опухолей, использовалась фотодинамическая терапия, которая основана на использовании света определенной длины волны для возбуждения наночастиц и генерации тепла или активных оксигенированных частиц [2,21,22]. Хотя фотодинамическая терапия эффективна для лечения локализованных опухолей, ее практически невозможно использовать для уничтожения метастатических опухолей, распространившихся на несколько частей тела, поскольку не всегда возможно осветить различные, более глубокие части человеческого тела.

Методы химиотерапии, в которых используются такие препараты, как доксорубин и паклитаксел, являются золотым стандартом клинических методов уничтожения метастатических раковых клеток, но они также вредны для здоровых клеток. Следовательно, необходимы альтернативы, такие как конъюгаты наночастиц золота и BLA, которые не токсичны для здоровых клеток [7,23]. Наночастицы золота можно комбинировать с другими природными химическими веществами, такими как пиррофторид-а и родственными молекулами, которые, как было показано, обладают противораковыми и фотофизическими свойствами, с образованием конъюгатов с повышенной эффективностью [24,25]. Помимо биологии рака, наночастицы золота использовались для нелинейной оптической визуализации, такой как генерация второй гармоники [26]. Может быть интересно изучить нелинейно-оптические свойства этих наночастиц в живых клетках и каплях липидного монослоя путем конъюгирования их с порфиринами, которые, как было показано, обладают чрезвычайно высокими нелинейно-оптическими свойствами [27]. Наночастицы золота также нашли применение в нейронной модуляции в качестве альтернативы оптогенетике. Кроме того, может быть интересно создать их конъюгаты с различными оптическими красителями для создания единого агента, который может одновременно модулировать нейроны и воспринимать потенциалы действия [28,29]. В целом, применение наночастиц золота растет в геометрической прогрессии, и крайне необходимы новые, более экологичные методы, которые могут синтезировать стабильные, самоорганизующиеся наночастицы, и мы попытались нацелиться на эту работу.

Вклад авторов: АК и СП разработали и задумали проект. АК разработал протокол синтеза наночастиц золота, синтезировал все образцы и охарактеризовал их. СП курировал проект. АК написал статью. Все авторы внесли свой вклад в написание рукописи. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Это исследование получило финансирование от Департамента биотехнологии правительства Индии и Национального технологического института в Руркеле, Индия.

Заявление Институционального наблюдательного совета: Неприменимо.

Заявление об информированном согласии: Не применимо.

Заявление о доступности данных: Все данные присутствуют в рукописи. Дополнительные данные могут быть предоставлены по обоснованному запросу соответствующих авторов.

Благодарности: Мы благодарим Сунила Кумара Саранги, Дипендру К. Бана, Кунала Пала, Сирсенду Сехара Рэя из Национального технологического института Руркела за полезные обсуждения.

Конфликты интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Рекомендации

1. Дэниел, М.-К.; Астрык, Д. Наночастицы золота: сборка, супрамолекулярная химия, квантово-размерные свойства и применение в биологии, катализе и нанотехнологиях. хим. Ред. 2004, 104, 293. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Растихад, Арканзас; Анастос, Х.; Вайсвол, Э.; Винокер, Дж. С.; Сфакианос, JP; Доппалапуди, СК; Каррик, MR; Кнауэр, CJ; Таули, Б.; Льюис, Южная Каролина; и другие. Фототермическая абляция опухолей предстательной железы с использованием золотых нанооболочек в ходе пилотного клинического исследования устройства. Учеб. Натл. акад. наук. США 2019, 116, 18590. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Гао, К.; Чжан, Дж.; Гао, Дж.; Чжан, З.; Чжу, Х.; Ван, Д. Наночастицы золота в тераностике рака. Передний. Биоинж. Биотехнология. 2021, 9, 647905. [\[CrossRef\]](#)
4. Штандера, К.; Горцкевич, М.; Клайн-Макулевич, Б. Наночастицы золота в лечении рака. Мол. Фарм. 2019, 16, 1–23. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
5. Свенссон, М.; Сабхарвал, Х.; Хоканссон, А.; Моссберг, А.-К.; Липнюнас, П.; Леффлер, Х.; Сванборг, К.; Линс, С. Молекулярная характеристика вариантов сворачивания α-лактальбумина, индуцирующих апоптоз в опухолевых клетках*. Ж. Биол. хим. 1999, 274, 6388. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

6. Шаббирахмед, А.М.; Кумаравель, М.; Сому, П.; Пол, С.; Хадриа, А. Последние достижения в области наноматериалов для фотодинамической терапии рака ВТ — Справочник по окислительному стрессу при раке: терапевтические аспекты; Чакраборти, С., Ред.; Спрингер: Сингапур, 2021 г.; стр. 1–24.
7. Ян Дж.; Ван, Т.; Чжао, Л.; Раджасекхар, ВК; Джоши, С.; Андреу, К.; Пал, С.; Сюй, Х.; Чжан, Х.; Коэн, Ай-Джей; и другие. Нанозонды золота/альфа-лактальбумин для визуализации и лечения рака молочной железы. Нат. Биомед. англ. 2020, 4, 686. [\[CrossRef\]](#)
8. Ван, А.; Нг, ХП; Сюй, Ю.; Ли, Ю.; Чжэн, Ю.; Ю, Дж.; Хан, Ф.; Пэн, Ф.; Фу, Л. Наночастицы золота: синтез, тест на стабильность и приложение для выращивания риса. Дж. Наноматер. 2014, 2014, 451232. [\[CrossRef\]](#)
9. Офир, Ю.; Саманта, Б.; Ротелло, В.М. Самосборка наночастиц золота, опосредованная полимером и биополимером [†]. хим. Соц. Ред. 2008 г., 37, 1814. [\[CrossRef\]](#)
10. Камидзима, Т.; Омуре, А.; Сато, Т.; Акимото, К.; Итабаши, М.; Мизугути, М.; Камия, М.; Кикукава, Т.; Айзава, Т.; Такахаши, М.; и другие. Метод термической обработки для производства альфа-лактальбумина, связанного с жирными кислотами, который вызывает гибель опухолевых клеток. Биохим. Биофиз. Рез. Коммун. 2008, 376, 211. [\[CrossRef\]](#)
11. Туркевич Ю.; Стивенсон, ПК; Хиллер, Дж. Исследование процессов зарождения и роста при синтезе коллоидного золота. Обсуждать. Фарадей Соц. 1951, 11, 55. [\[CrossRef\]](#)
12. Филип, Д.; Унни, К. Внеклеточный биосинтез наночастиц золота и серебра с использованием листьев Кришны тулси (*Ocimum Sanctum*). Физ. Е Низкие размеры. Сист. Наноструктур. 2011, 43, 1318. [\[CrossRef\]](#)
13. Филип Д. Грин. Синтез наночастиц золота и серебра с использованием *Hibiscus rosa sinensis*. Физ. Е Низкие размеры. Сист. Наноструктур. 2010, 42, 1417. [\[CrossRef\]](#)
14. Ройер, К.А. Исследование сворачивания белков и конформационных переходов с помощью флуоресценции. хим. Ред. 2006, 106, 1769. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)
15. Ройер, Калифорния; Хинк, АР; Лох, СН; Прехода, КЕ; Пэн, Х.; Джонос, Дж.; Маркли, Дж. Л. Влияние аминокислотных замен на денатурацию стафилококковой нуклеазы под давлением, наблюдаемое с помощью флуоресценции и спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Биохимия 1993, 32, 5222. [\[CrossRef\]](#)
16. Хадриа, А. Получение бинарного комплекса наночастиц золота с альфа-лактальбумином для терапии рака молочной железы. Бакалаврская диссертация, Национальный технологический институт, Руркела, Индия, 2012 г.
17. Биан, К.; Шунк, Х.; Йе, Д.; Хван, А.; Лук, Т.С.; Ли, Р.; Ван, З.; Фан, Х. Формирование самоорганизующихся суперкристаллов наночастиц золота с фасетно-зависимой поверхностной плазмонной связью. Нат. Коммун. 2018, 9, 2365.
18. Ван, К.; Сиу, К.; Чжан, Дж.; Фанг, Дж. Понимание сил, действующих при самосборке, и их значение для построения. трехмерные (3D) суперкристаллы. Нано Рез. 2015, 8, 2445. [\[CrossRef\]](#)
19. Фэн, К.; Шен, Ю.; Фу, Ю.; Муроски, Мэн; Чжан, П.; Ван, К.; Сюй, К.; Лесняк, М.С.; Ли, Г.; Ченг, Ю. Самосборка наночастиц золота демонстрирует динамическое переключение, опосредованное микроокружением, и улучшенное нацеливание на опухоли головного мозга. Тераностика, 2017, 7, 1875. [\[CrossRef\]](#)
20. Листвет С.М.; Волден, С.; Гальскау, О.; Гломм, В.Р. Иммобилизация наночастиц золота изменяет взаимодействие α-лактальбумина с чистыми и смешанными монослоями фосфолипидов. Мягкая материя 2011, 7, 11501. [\[CrossRef\]](#)
21. Ху, Ф.; Сюй, С.; Лю, Б. Фотосенсибилизаторы с эмиссией, вызванной агрегацией: материалы и биомедицинские применения. Адв. Матер. 2018, 30, 1801350.
22. Стон, Дж.; Пэн, К. Очерк истории PDT. Противораковый Рез. 2003, 23, 3591.
23. Судха, Т.; Бхарали, диджей; Ялчин, М.; Дарвиш, ННЕ; Джошкун, доктор медицинских наук; Китинг, штат Калифорния; Лин, Х.-Ю.; Дэвис, Пи Джей; Муса, С.А. Направленная доставка паклитаксела и доксорубина к ксенотрансплантатам рака через наночастицы нано-диамино-тетрака. Межд. Дж. Наномед. 2017, 12, 1305. [\[CrossRef\]](#)
24. Канг, С.Х.; Нафиуджаман, М.; Нуруннаби, М.; Ли, Л.; Хан, ХА; Чо, К.Дж.; Ха, КМ; Ли, Ю. Гибридный фотоактивный наноматериал, состоящий из наночастиц золота, феофорбида-А и гиалуроновой кислоты, в качестве целевой бимодальной фототерапии. Макромол. Рез. 2015, 23, 474. [\[CrossRef\]](#)
25. Хадриа А.; де Коэн, Ю.; Гавель, П.; Рош, К.; Клейс, К.; Андерсон, Х.Л. Двухтактные пиреофорбиды для нелинейной оптики визуализация [†]. Орг. Биомол. хим. 2017, 15, 947. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Кларк, Х.А.; Кампаньола, Пиджей; Вускелл, JP; Льюис, А.; Лоу, Л.М. Свойства флуоресцентной генерации второй гармоники Наночастицы золота, инкапсулированные в полимер. Варенье. хим. Соц. 2000, 122, 10234. [\[CrossRef\]](#)
27. Хадриа А.; Флейшхауэр, Дж.; Бочаров, И.; Уилкинсон, доктор медицинских наук; Коль, ММ; Андерсон, Х.Л. Порфириновые красители для нелинейной оптики Визуализация живых клеток. iScience 2018, 4, 153. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)
28. Хуанг, К.; Доу, К.; Ло, ХJ Оптогенетика, опосредованная наноматериалами: возможности и проблемы. РСК Адв. 2016, 6, 60896. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
29. Хадриа А. Инструменты для измерения мембранного потенциала нейронов. Биомед. Дж. 2022 г., в печати. [\[Перекрестная ссылка\]](#)