

УДК 003.26

КОНСТРУКЦИЯ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ, СОВМЕСТИМЫХ СО СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

К. Д. ЯШИН, В. С. ОСИПОВИЧ

Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники
П. Бровка, 6, Минск, 220013, Беларусь

Поступила в редакцию 16 сентября 2009

Исследованы полупроводниковые люминесцентные наночастицы селенида кадмия CdSe, покрытые слоем сульфида цинка ZnS. Изучено влияние конструкции внешней функционально-защитной оболочки наночастиц из органических лигандов на жизнеспособность стволовых клеток. В качестве оболочки, стабилизирующей наночастицы CdSe/ZnS в водных растворах, были использованы такие бифункциональные тиолы как цистеин, тиогликолевая кислота, меркаптоундекановая кислота и тиополиэтиленгликоль. Для придания наночастицам CdSe/ZnS биосовместимых свойств внешняя оболочка из меркаптоундекановой кислоты дополнительно была модифицирована белковыми молекулами. Показано, что наночастицы всех изученных конструкций достаточно хорошо проникают в стволовые клетки. Белковые покрытия уменьшают цитотоксичность и тем самым улучшают биосовместимость гидрофильных наночастиц со стволовыми клетками.

Ключевые слова: нанокристаллы, полупроводниковые наночастицы, конструкция наночастиц, биосовместимость, жизнеспособность клеток, бифункциональные тиолы, стволовые клетки.

Введение

Разработка сенсорных устройств рассматривается как одно из перспективных направлений научных разработок, имеющих огромный рынок сбыта, что обусловлено их использованием в медицинской диагностике. Исследования последних лет в области наноматериалов показали перспективность применения наночастиц (НЧ) в биоинженерии. Эти исследования открывают новые перспективы для миниатюризации оптических биосенсоров [1, 2]. В настоящее время на оптическом принципе базируются иммунохимические схемы анализа, которые используют биомаркеры с красителями в качестве флуоресцентной метки [3, 4]. Конъюгаты наночастиц с биомолекулами рассматривают как реальную замену флуорофорам при использовании в медицине и биологии. Действительно, флуоресцентные конъюгаты наночастиц с антителами более фотостабильны по сравнению с традиционными органическими флуоресцентными красителями [5, 6]. При этом наночастицам присущ широкий спектр возбуждения, а свет они испускают в узком спектральном диапазоне. Варьируя размером наночастиц, можно создавать биомаркеры с регулируемой длиной волны испускаемого света [6].

Широкое применение наночастиц в качестве маркеров требует использования внешней функционально-защитной оболочки для стабилизации наночастиц в водных растворах, а также необходимости уменьшения их токсичности. В качестве защитной оболочки могут быть использованы разнообразные органические соединения, в частности глутатионовая кислота, меркаптопропионовая кислота и другие соединения [7, 8].

В [9–11] представлялись результаты исследований физических свойств полупроводниковых люминесцентных нанокристаллов. Настоящая работа является продолжением этой темы. С целью долговременной фиксации наночастиц в клетках исследовано влияние конструкции

внешней оболочки наночастиц из органических лигандов на жизнедеятельность стволовых клеток.

Цель настоящей работы — исследование влияния конструкции внешней функционально-защитной оболочки наночастиц из органических лигандов на жизнеспособность стволовых клеток. В качестве функционально-защитных оболочек, стабилизирующих наночастицы CdSe/ZnS в водных растворах, будут использованы такие бифункциональные тиолы, как цистеин, тиогликолевая кислота, меркаптоундекановая кислота и тиополиэтиленгликоль. Кроме того, будут проведены исследования наночастиц, внешняя оболочка которых дополнительно модифицирована белковыми молекулами.

Методика эксперимента

Наночастицы селенида кадмия, покрытые слоем из сульфида цинка CdSe/ZnS, были синтезированы методами коллоидной химии по технологии, описанной в [12, 13], используя триоктилфосфиноксид (ТОФО) в качестве внешней стабилизирующей оболочки. Схемы процессов получения нанокристаллов приведены в [9, 14, 15]. Наночастицы имеют кристаллическую структуру, что подтверждено рентгеноструктурными исследованиями [9, 15]. Нанокристаллы CdSe/ZnS состоят на 54% из атомов кадмия, на 20% из атомов селена, на 14% из атомов цинка и на 12% атомов серы, что подтверждено рентгеноспектральным анализом [9]. Сульфид цинка ZnS увеличивает в 3–3,5 раза квантовый выход флуоресценции наночастиц CdSe [10, 11].

Для перевода наночастиц в водную фазу и предотвращения их гидролиза кристаллы CdSe/ZnS покрывали различными стабилизирующими покрытиями, такими как цистеин, тиогликолевая кислота, меркаптоундекановая кислота (МУК) и тиополиэтиленгликоль. Стабилизацию наночастиц бифункциональными тиолами осуществляли путем замены гидрофобной оболочки ТОФО на тиолсодержащие молекулы. Для этого раствор ТОФО-стабилизированных НЧ (1 мг/мл) растворяли в хлороформе и осаждали метанолом. После центрифугирования осадок НЧ растворяли в толуоле и осаждали метанольным раствором, содержащим соответствующий тиол. Выпавший осадок НЧ промывали изопропанолом и растворяли в воде. Кроме того, для придания наночастицам CdSe/ZnS биосовместимых свойств, внешняя сфера из меркаптоундекановой кислоты была модифицирована белковыми молекулами БСА [12]. Низкое содержание аминокислот достигается биотинилированием не менее 30% аминокислот через активацию карбоксильных групп с помощью NHS и EDC [16]. Для этого к 200 мкл свежеприготовленной смеси, содержащей EDC и NHS в буфере MES [16], добавляли водный раствор наночастиц и спустя 5 мин., реакционную смесь пропускали через колонку, заполненную гелем декстрана с целью очистки конъюгатов НЧ с белком от исходных реагентов.

Для подтверждения наличия белковой оболочки на поверхности наночастиц конъюгаты адсорбировали на полосках стрептавидина, сформированных на поверхности кремния с применением микроконтактной печати. Спектры фотолюминесценции записывали на спектрофотометре FluoroMax-350 (США). Для снятия спектров были использованы длины волн света возбуждения, равные 350 нм (для НЧ с функционально-защитной оболочкой из органических лигандов) и 310 нм (для НЧ с оболочкой БСА). Максимум интенсивности фотолюминесценции изученных в работе нанокристаллов CdSe/ZnS приходился на длину волны 565 нм. Визуальную оценку взаимодействия культур клеток с наночастицами проводили с использованием люминесцентного микроскопа Nikon D300 (Япония) при увеличении в 200 и 1000 крат. Морфологию пленок стрептавидина с наночастицами исследовали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). АСМ-исследования выполнены на сканирующем зондовом микроскопе "Nanoscope 3D" (США). Частота строчной развертки при получении изображения составляла 5 Гц. Морфологию поверхности изучали в контактном режиме, при этом использовали контактные кантилеверы "NP-10" из нитрида кремния Si₃N₄ с константой упругости 0,12 Н/м.

Результаты и их обсуждение

Замена в конструкции НЧ стабилизирующей гидрофобной оболочки из ТОФО на оболочку из бифункционального тиола преследовала две цели: 1) получить гидрофильные наночастицы с концевыми –ОН или –COOH группами; 2) ввести группы, пригодные для иммобилиза-

ции белка. Функционально-защитная оболочка наночастиц из бифункционального тиола представляет собой самоорганизующийся монослой из плотноупакованных органических молекул, которые эффективно препятствуют разрушению CdSe/ZnS в воде. Наночастицы с внешней функционально-защитной оболочкой из меркаптоундекановой кислоты были дополнительно покрыты БСА. После синтеза конъюгатов нанокристаллов с БСА было зафиксировано уменьшение интенсивности их флуоресценции с сохранением длины волны пика флуоресценции (рис. 1). Кроме того, изменился спектр возбуждения: произошло его смещение в ультрафиолетовую область (рис. 2).

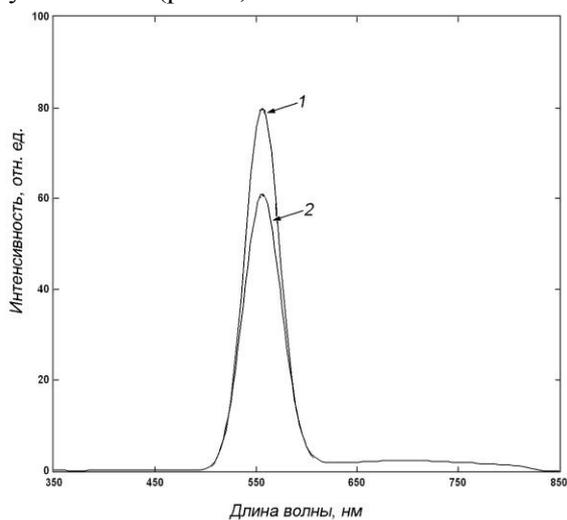


Рис. 1. Спектры люминесценции растворов исследованных наночастиц: 1 — оболочка МУК, 2 — оболочка МУК/БСА

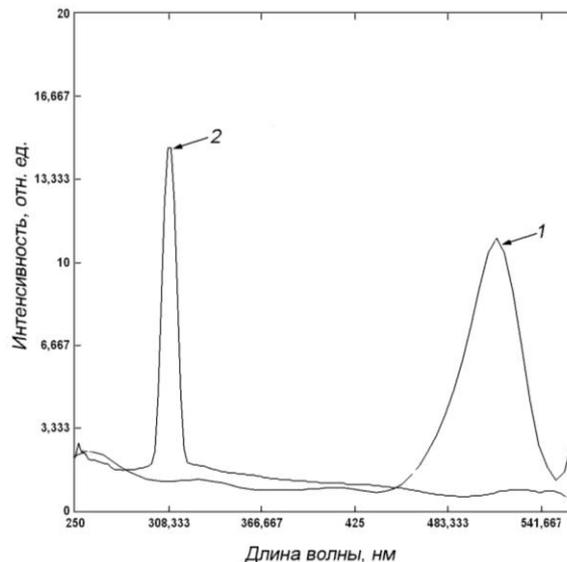


Рис. 2. Спектры возбуждения растворов исследованных наночастиц: 1 — оболочка МУК, 2 — оболочка МУК/БСА

Эффективная флуоресценция гидрофильных наночастиц с различными концевыми функциональными группами позволила исследовать их внедрение в клеточные структуры с использованием люминесцентного микроскопа. Полученные результаты оценки влияния конструкции НЧ на жизнеспособность стволовых клеток сведены в таблицу. В случае НЧ, покрытых тиогликолевой кислотой, наблюдали хорошее проникновение наночастиц в стволовые клетки. Проявлялась относительно высокая цитотоксичность наночастиц — они угнетали деление и рост стволовых клеток. Было зафиксировано относительно невысокое время жизни клеток в суспензии с наночастицами (менее 2 ч). Наблюдалась низкая стабильность НЧ в клеточной суспензии, о чем свидетельствует исчезновение флуоресценции из-за гидролиза НЧ. Аналогичные результаты были получены и при проведении эксперимента с использованием наночастиц с цистеином. Наночастицы, стабилизированные меркаптоундекановой кислотой, также эффективно проникали в стволовые клетки (рис. 3). При этом была зафиксирована относительно высокая цитотоксичность наночастиц с МУК, поскольку они угнетали деление и рост стволовых клеток. Однако в отличие от предыдущих двух экспериментов (покрытия из тиогликолевой кислоты и цистеина) была установлена высокая стабильность наночастиц, покрытых МУК, в клеточной суспензии. В эксперименте с тиополиэтиленгликолем проявилась относительно низкая цитотоксичность наночастиц, поскольку рост клеток не угнетался. Наблюдалось слабое проникновение наночастиц в стволовые клетки. Наночастицы, практически не препятствуя росту клеток, угнетали их деление.

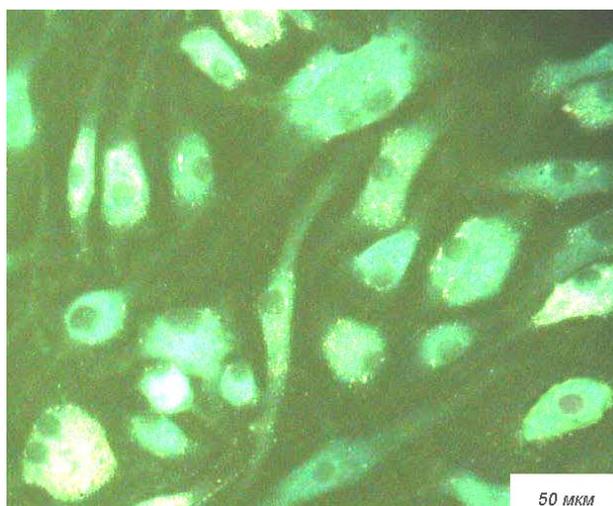


Рис. 3. Фотография культуры ствольных клеток с наночастицами с оболочкой МУК

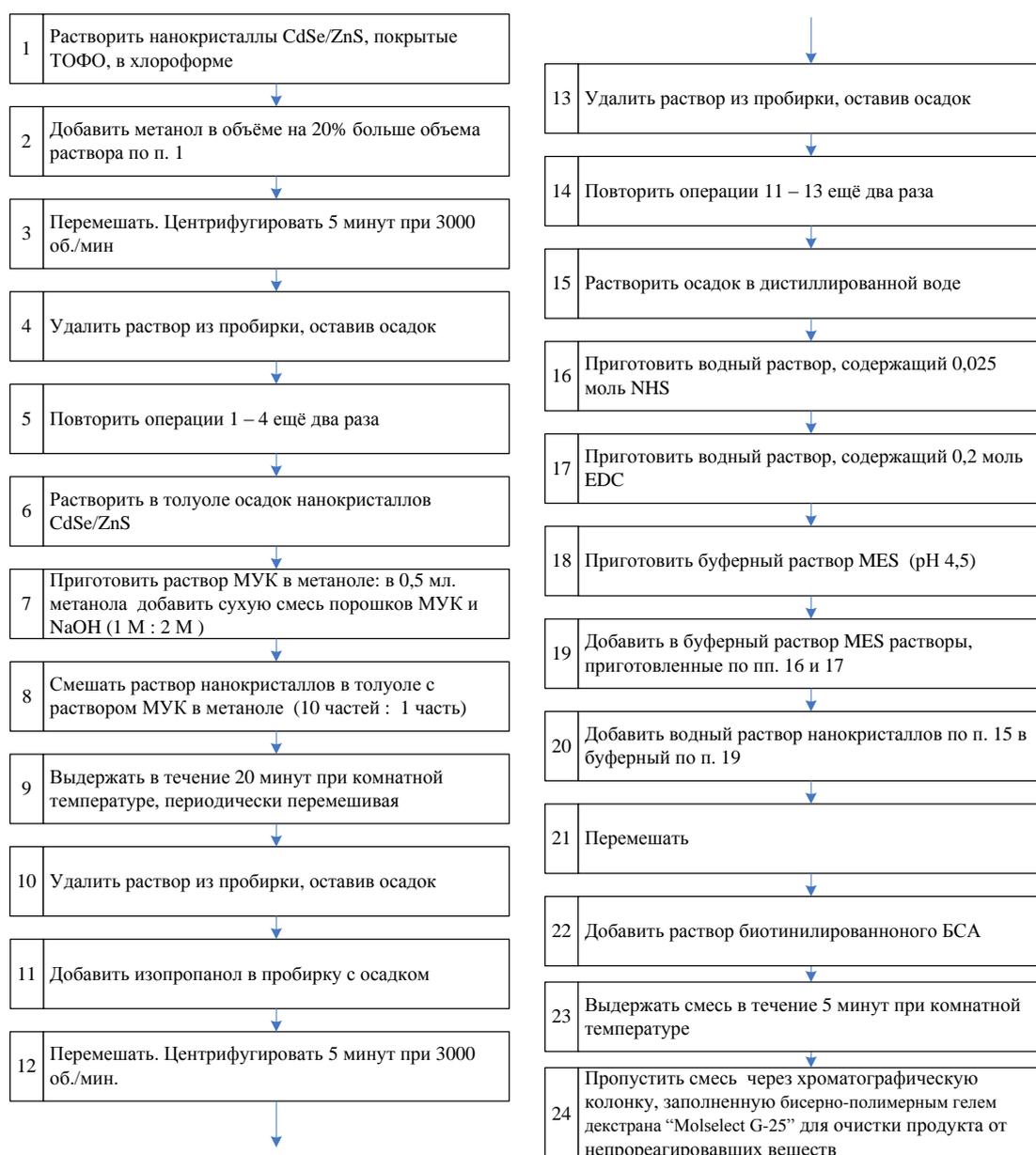


Рис. 4. Базовый технологический процесс получения наночастиц, связанных с белковыми молекулами

Влияние конструкции полупроводниковых наночастиц на жизнеспособность стволовых клеток

Конструкции покрытий	Результаты положительные	Результаты отрицательные	Выводы и объяснения результатов
Тиогликолевая кислота (меркаптоуксусная кислота)	Наблюдается хорошее проникновение наночастиц в стволовые клетки	Проявляется относительно высокая цитотоксичность наночастиц: наночастицы угнетают деление и рост стволовых клеток. Зафиксирована относительно невысокое время жизни в клеточной суспензии наночастиц (менее 2 ч)	Покрытие из тиогликолевой кислоты обладает относительно меньшей плотностью по сравнению с покрытием из меркаптоундекановой кислоты
Цистеин	Наблюдается хорошее проникновение наночастиц в стволовые клетки	Проявляется относительно высокая цитотоксичность наночастиц: наночастицы угнетают деление и рост стволовых клеток. Зафиксирована относительно невысокое время жизни в клеточной суспензии наночастиц (менее 2 ч)	Покрытие из тиогликолевой кислоты обладает относительно меньшей плотностью по сравнению с покрытием из меркаптоундекановой кислоты
Меркаптоундекановая кислота (МУК)	Наблюдается хорошее проникновение наночастиц в стволовые клетки. Зафиксирована высокая стабильность наночастиц, покрытых МУК, в клеточной суспензии	Проявляется относительно высокая цитотоксичность наночастиц: наночастицы угнетают деление и рост стволовых клеток	Покрытие из МУК обладает довольно высокой плотностью и достаточно хорошо защищает нанокристаллы от гидролиза в физиологических растворах
Тиосодержащий полиэтиленгликоль	Проявляется относительно низкая цитотоксичность наночастиц: наночастицы не угнетают рост клеток	Наблюдается слабое проникновение наночастиц в стволовые клетки. Наночастицы, практически не препятствуя росту клеток, угнетают их деление	Уменьшение цитотоксичности наночастиц, покрытых тиополиэтиленгликолем, по сравнению с покрытиями из меркаптоундекановой и тиогликолевой кислот, объясняется тем, что кислоты имеют карбоксильные функциональные группы, а тиополиэтиленгликоль — гидроксильные функциональные группы
Меркаптоундекановая кислота и БСА	Отсутствует цитотоксичность наночастиц: наночастицы не угнетают деление стволовых клеток и не подавляют их рост. Наблюдается хорошее проникновение наночастиц в стволовые клетки	Потребовалась дополнительная очистка суспензии, содержащей БСА с наночастицами, от избытка белка	Наночастицы, покрытые БСА, а также БСА и стрептавидином, не обладают цитотоксичностью по сравнению с наночастицами, защищенными меркаптоундекановой, тиогликолевой кислотами и тиополиэтиленгликолем. Объясняется это тем, что на поверхности наночастиц нет активных центров для закрепления белка (карбоксильных групп) и объект "наночастица-белок" рассматривается стволовой клеткой как белковая молекула
Меркаптоундекановая кислота, БСА и стрептавидин	Отсутствует цитотоксичность наночастиц: наночастицы не угнетают деление стволовых клеток и не подавляют их рост. Наблюдается хорошее проникновение наночастиц в стволовые клетки	Потребовалась дополнительная очистка суспензии, содержащей БСА и стрептавидин с наночастицами, от избытка белка	

Факт образования комплекса НЧ с БСА подтверждается данными атомно-силовой микроскопии. С помощью микроконтактной печати, на поверхности кремния был создан микрорельеф пленки из стрептавидина. Затем, после связывания CdSe/ZnS-наночастиц с БСА и удаления непрореагировавших белковых молекул, полученный раствор наносили на поверхность кремниевой подложки с микроконтактной печатью стрептавидина и, выдержав 15 мин, промывали водой. Нанокристаллы, связавшиеся с БСА, должны адсорбироваться локально только на поверхность стрептавидина, что обусловлено селективным взаимодействием БСА со стрептавидином (константа связывания $\sim 10^{-15}$). Действительно, изображение наночастиц на микроструктурированной поверхности визуализируется в виде отдельных точек (рис. 5,а). Цветовой

контраст НЧ в виде светлых точек (рис. 5,б) отражает отличия в свойствах частиц и поверхности, на которой они адсорбированы. Локализация конъюгатов НЧ исключительно на полосках стрептавидина подтверждает наличие молекул БСА на поверхности наночастиц. Анализ размеров конъюгатов наночастиц с БСА показывает, что их средний размер составляет примерно 12 нм. Немодифицированные белком наночастицы CdSe/ZnS/МУК имеют средний размер — примерно 8 нм. Толщина белковой оболочки порядка 2 нм хорошо согласуется с размерами молекулы БСА (около 2 нм). При этом ядро CdSe по результатам электронной микроскопии имеет размер около 4 нм [17].

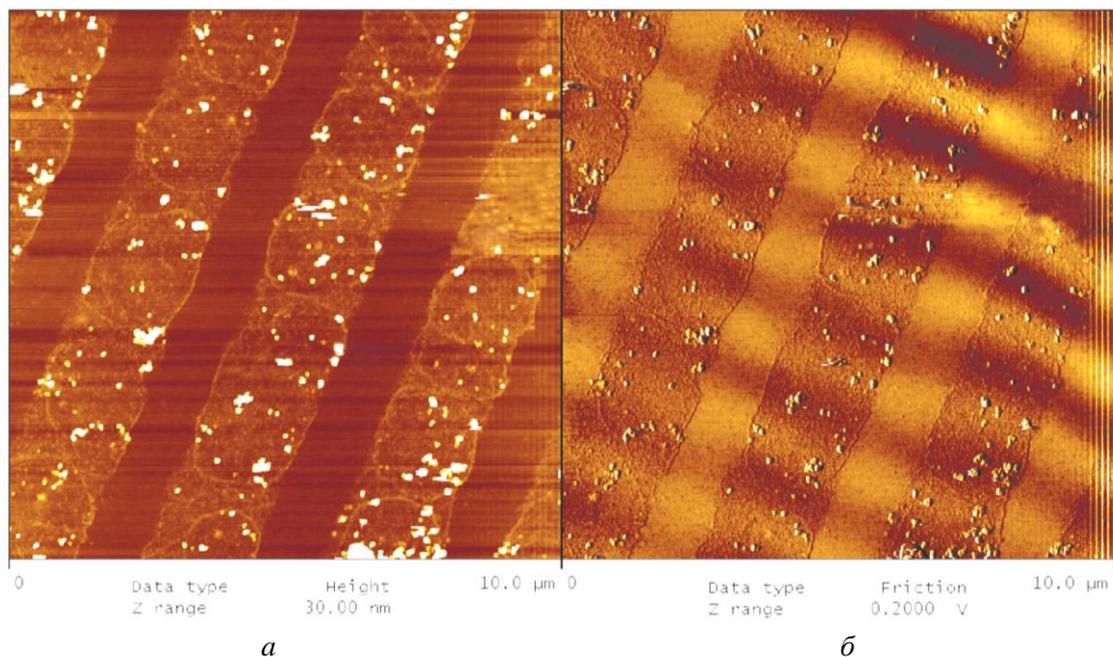


Рис. 5. Изображение наночастиц, закрепившихся на стрептавидине: *а* — изображение поверхности в контактном режиме сканирования; *б* — изображение поверхности в режиме измерения трения

Заключение

Таким образом, наличие в конструкции фотолуминесцентных наночастиц элемента из белковой оболочки дает возможность, во-первых, придать наночастицам биосовместимость, во-вторых, проводить последующую сборку наночастиц с антителами, специфично взаимодействующими с антигенами, белками-маркерами, вирусами и др.

Авторы выражают благодарность Г.К. Жавнерко, З.Б. Квачеву, и И.В. Пыко за содействие в проведении исследований.

CONSTRUCTION OF SEMICONDUCTOR NANOPARTICLES, COMPATIBLE WITH STEM CELLS

K.D. YASHIN, V.S. OSIPOVICH

Abstract

Semiconductor luminescent nanoparticles cadmium selenide CdSe covered with layer of zink sulfide ZnS are researched. The influence of construction of external functional and protective cover made of organic ligands on the stem cells viability is studied. As a cover that stabilize nanoparticles CdSe/ZnS in water solution were used such bifunctional thiols as cysteine, thioglycolic acid, mercaptoundecan acid and thiopolyethylene glycol. In order to add biocompatible properties to nanoparticles CdSe/ZnS external cover made of mercaptoundecan acid was modified in addition by protein

molecules. It is shown, that nanoparticles of all studied constructions have good stem cells penetration. Protein covers decrease cytotoxicity and thus improve biocompatibility of water-soluble nanoparticles with stem cells.

Литература

1. *Kostov Y., Rao G.* // Review of Scientific Instruments. 2000. Vol. 71. P. 4361–4366.
2. *Яшин К.Д., Осипович В.С.* // Нано- и микросистемная техника. 2007. № 2. С. 70–77.
3. *Willner I., Willner B., Katz E.* // Bioelectrochemistry. 2007. Vol. 70. P. 2–9.
4. *Яшин К.Д., Осипович В.С.* // Нано- и микросистемная техника. 2008. № 12 (101). С. 48–56.
5. *Burda C., Chen X., El-Sayed M.A.* // Chem. Rev. 2005. Vol. 105. P. 1025–1031.
6. *Sapsford K.E., Pons T., Medintz I.L., Mattoussi H.* // Sensors. 2006. Vol. 6. P. 925–932.
7. *Kane, R.S., Stroock, A.D.* // Biotechnol. Prog., 2007. Vol. 23. P. 316–322.
8. *Love J.Ch., Estroff L.A., Whitesides G.M.* // Chem. Rev. 2005. Vol. 105. P. 1103–1108.
9. *Яшин К.Д., Осипович В.С.* // Докл. БГУИР. 2007. № 3. С. 74–79.
10. *Яшин К.Д., Осипович В.С.* // Докл. БГУИР. 2008. № 2. С. 72–77.
11. *Яшин К.Д., Осипович В.С.* // Докл. БГУИР. 2008. № 3. С. 66–71.
12. *Artemyev M., Sukhanova A., Devy J. et al.* // Anal. Biochem. 2004. Vol. 324. P. 60–68.
13. *Kim S., Bawendi M.G., Lim Y.T. et al.* // Nat Biotech. 2004. Vol. 22(1). P. 93–97.
14. *Яшин К.Д., Осипович В.С.* // Нано- и микросистемная техника, 2007. № 5. С. 2–8.
15. *Яшин К.Д.* Разработка физико-химических и технологических основ получения люминесцентных наночастиц из полупроводников. Мн., 2005. 60 с. Деп. в ГУ "БелИСА" 07.04.06, № Д200617.
16. *Sehgal D., Vijay I.K.* // Anal. Biochem. 1994. Vol. 218. P. 87.
17. *Gaponenko S.Vol.* Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals, London, 1998.