

К. Д. Яшин¹, канд. техн. наук, доц.,
Т. И. Терпинская², канд. биол. наук, ст. науч. сотр.,
В. С. Осипович¹, канд. техн. наук, доц.,
Р. Г. Лемеш², инженер,
Г. К. Жавнерко³, канд. хим. наук, зав. лаб.,
Р. Д. Зильберман², мл. науч. сотр.,
В. С. Петрович¹, студент

¹Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники

²Институт физиологии НАН Беларуси

³Институт химии новых материалов НАН Беларуси

e-mail: seth22@mail.ru

ТЕХНОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ МЕДИЦИНСКОЙ НАНОБИОИНФОРМАЦИОННОЙ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОКРИСТАЛЛАХ

Поступила в редакцию 19.10.2011

Представлена конструкция флуоресцентных полупроводниковых нанобиомаркеров для визуализации опухолевых клеток in vitro.

Ключевые слова: нанобиоинформационная технология, флуоресцентные нанобиомаркеры, наночастица, диагностика опухолевых заболеваний, полупроводниковые нанокристаллы

Введение

В работах [1–3] освещены вопросы получения люминесцентных полупроводниковых нанокристаллов селенида кадмия с эпитаксиальным слоем оксидного цинка CdSe/ZnS, которые в научно-

технической литературе называют квантовыми точками. Нанобиоинформационные технологии являются бурно развивающимся научным направлением XXI века. Разработчики микросистемной техники активно сотрудничают с медицинскими учреждениями.

Целью настоящих исследований явилась разработка нанобиоинформационной технологии для задач диагностики опухолевых заболеваний. Актуальность обусловлена необходимостью диагностики заболеваний на самых ранних стадиях.

Принципы построения нанобиоинформационной системы на основе полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек)

Для визуализации процессов функционирования, взаимодействия клеток различных типов, выявления путей их миграции применяют их маркирование (мечение). Наиболее распространенным способом мечения живой клетки является введение в нее флуоресцентных зондов. Для этого используют органические флуоресцентные красители; в последнее десятилетие широкое применение получают квантовые точки, обладающие существенными преимуществами перед органическими красителями, в частности, по интенсивности и длительности флуоресценции [4–7]. Ведутся исследования по изучению взаимодействия наночастиц с живыми клетками.

Концепция построения и принцип действия системы для индикации и диагностики биологических клеток и клеточных компонентов описаны в работе [3]. *Информационная* составляющая наноразмерной биосистемы основана на флуоресценции нанокристаллов CdSe/ZnS, *биолого-медицинская* — на специфическом "узнавании" определенного вида

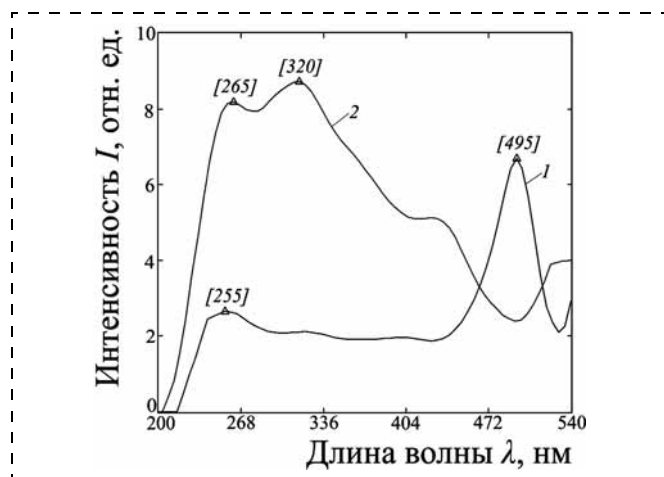


Рис. 2. Спектры возбуждения наночастиц:
1 — CdSe/ZnS; 2 — CdSe/ZnS с дополнительным белковым покрытием

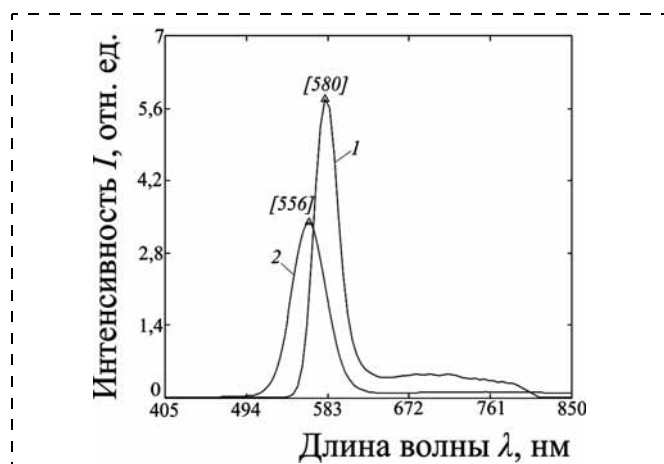


Рис. 3. Спектры испускания наночастиц:
1 — CdSe/ZnS; 2 — CdSe/ZnS с дополнительным белковым покрытием

клеток в анализируемых образцах; *полупроводниковая* — на применении наноразмерных A_2B_6 кристаллов. Кристаллы CdSe/ZnS фиксируются стабилизирующей оболочкой, позволяющей работать с полупроводниковыми частицами в физиологических растворах (рис. 1, см. третью сторону обложки). Оптический информационный сигнал полупроводниковой нанобиосистемы представлен на рис. 2, 3 в виде спектров возбуждения и испускания.

Материалы, конструкция, технология получения и применения нанобиомаркеров

Использовались кристаллы CdSe/ZnS, полученные по технологии, разработанной авторами работы [8]. Рентгеноструктурные и рентгеноспектральные исследования представлены в [3, 9]. Анализ образцов проводился с применением инфракрасного (ИК) Фурье-спектрометра. Наиболее интенсивные колебания отмечены в области $2956,40 \text{ см}^{-1}$ (рис. 4).

Для оценки цитотоксичности были исследованы нанобиомаркеры различной конструкции, ко-

торые отличались материалом стабилизирующей оболочки:

- образец № 1 — пассивирующая пленка из плотноупакованных молекул меркаптоундекановой кислоты;
- образец № 2 — тиогликолевая кислота;
- образец № 3 — цистеин.

Максимум флуоресценции приходится на 568 нм, 597 нм и 583 нм соответственно. Для оценки размеров наноструктур образца № 1 было проведено их исследование с применением атомно-силовой микроскопии (АСМ) на сканирующем зондовом микроскопе "Nanoscope 3D" (рис. 5). Образцы изучали в контактном режиме, использовали кантилеверы из нитрида кремния с константой упругости $0,12 \text{ Н/м}$ (рис. 6, 7). Параметры иглы: высота $3,0 \text{ мкм}$; радиус закругления 20 нм ; длина 4 мкм ; толщина $0,6 \text{ мкм}$; покрытие $15 \text{ нм Сг} + 60 \text{ нм Au}$; частота 20 кГц .

Результаты (рис. 8, см. третью сторону обложки) показывают, что маркеры микроскопа находятся на разных по высоте уровнях, и расстояние между уровнями составляет 8 нм . На поверхности подложки находятся гидрофильные наноструктуры (светлые точки на изображении сканирования поверхности). Они дают пики в секционном анализе. Размеры меркаптоундекановой кислоты составляют примерно $1,4...2 \text{ нм}$. Следовательно, исследуемые нанокристаллы CdSe/ZnS имеют размер $3...4 \text{ нм}$. На рис. 9 (см. третью сторону обложки) приведена люминесцентная фотография исследованных образцов.

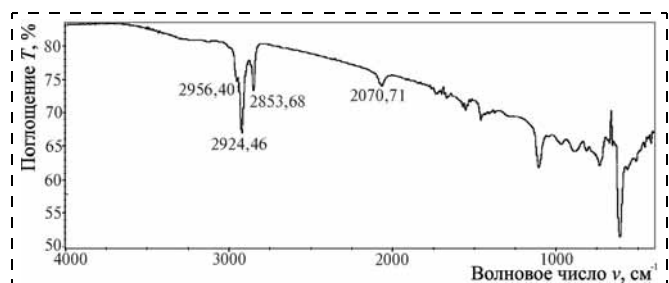


Рис. 4. ИК Фурье-спектр исходных CdSe/ZnS наночастиц



Рис. 5. Атомно-силовой микроскоп "Nanoscope 3D" (США)

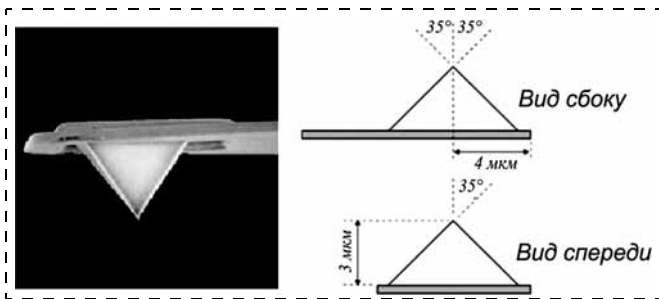


Рис. 6. Игла NP-1, вид сбоку и вид спереди

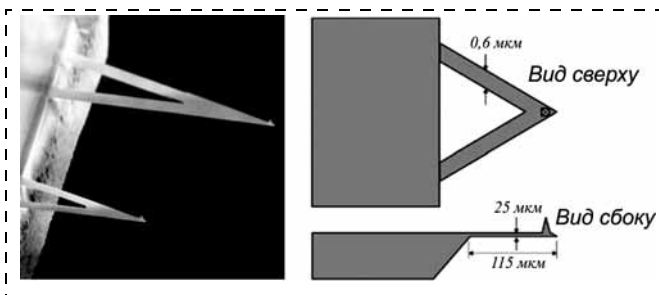


Рис. 7. Игла NP-1, вид сверху и вид сбоку

Биологический материал мышей представлял опухоли: асцитную карциному Эрлиха (АКЭ) и асцитную гепатому 22а (АГ22а). Клеточные суспензии анализировали на флуоресцентном микроскопе Leitz MPV-2. Для наблюдения и регистрации флуоресценции использовали систему Рюеторак, для возбуждения флуоресценции — ртутную лампу. Снимки выполняли цифровой камерой Leica DC300 F с программным комплексом Leica IM1000. Иллюстрации получены с использованием программы Image J: функции "Color RGB split" и "Type 8-bit".

Результаты и их обсуждение

Было изучено поглощение наночастиц клетками опухолевых асцитов. Зафиксировано поглощение клетками АКЭ наночастиц всех трех образцов (рис. 10, см. четвертую сторону обложки). При этом частицы образцов № 1 и № 3 в большинстве клеток равномерно распределялись преимущественно в околочелювном пространстве. В то же время после инкубации клеток с частицами образцов № 2 были видны более крупные ярко флуоресцирующие гранулы. Различное распределение нанокристаллов в цитоплазме может быть свидетельством различий в механизмах поглощения наночастиц клетками. Так, авторы [6] показали, что полистереновые наносферы (40 нм) и квантовые точки CdSe/ZnS с полиэтиленгликолиевым пассивирующим покрытием (20 нм) различным образом распределяются в цитоплазме растительных протопластов.

При инкубации клеток АКЭ с наночастицами не зарегистрирована цитотоксичность последних. Она снизилась лишь на 5...9 %, однако отличий между опытными сериями и контрольными сери-

Жизнеспособность клеток асцитной карциномы Эрлиха

№ п/п	Серия опыта	Жизнеспособность клеток АКЭ, %
1	АКЭ + образец № 1	89,4 ± 2,1
2	АКЭ + образец № 2	92,9 ± 0,8
3	АКЭ + образец № 3	90,6 ± 2,5
4	АКЭ + дистиллированная вода, без наночастиц	90,5 ± 1,8
5	АКЭ, исходный, до окраски	98,1 ± 1,6

ями (вместо наночастиц использовали дистиллированную воду) не наблюдали (см. таблицу).

При инкубации АГ22а с наночастицами последние проникали в клетки. Не выявлено значительных отличий в окрашивании клеток при инкубации их с частицами всех трех типов. Наблюдалась агрегация наночастиц (рис. 11, см. четвертую сторону обложки) в изотоническом растворе, что вело к снижению качества окраски, окрашивалась лишь часть клеток опухолевого асцита. Так, при использовании образца № 1 наблюдалась флуоресценция части клеток опухолевого асцита; в единичных клетках наблюдалось яркое свечение по всему фону, в большинстве клеток флуоресцировала клеточная мембрана (рис. 11, а). Для тушения флуоресценции нанокристаллов, не вошедших в клетки, использовали трипановый синий (рис. 11, б). Применение трипанового синего показало, что интенсивно поглощают нанокристаллы погибшие клетки (свечение нанокристаллов в погибших клетках постепенно тушится трипановым синим и заменяется красной флуоресценцией, характерной для этого красителя) и единичные живые клетки. В большинстве клеток нанокристаллы оседают на клеточной мембране с наружной стороны, и их свечение тоже постепенно тушится трипановым синим (ср. рис. 11, а и 11, б).

При инкубации клеток асцита АГ22а с частицами образца № 2 наблюдалось яркое свечение единичных живых клеток и флуоресценция квантовых точек в примембранном пространстве внутри клеток; причем наночастицы видны в виде мелких гранул на мембране (рис. 11, в). Для сравнения, при инкубации наночастиц с клетками костного мозга последние захватывали частицы и сохраняли флуоресценцию при добавлении трипанового синего, что свидетельствует о проникновении квантовых точек внутрь клеток [10]. Следует отметить, что во всех случаях клетки костного мозга лучше поглощали наночастицы, чем клетки опухолевых асцитов. Вероятно, это объясняется различными механизмами поглощения [7, 10, 11]. При окраске асцита частицами образца № 3 наблюдали аналогичную картину, однако проникновение квантовых точек в опухолевые клетки было несколько лучше, и при добавлении трипанового синего флуоресценция в околочелювном пространстве в большинстве клеток сохранялась (рис. 11, г).

Таким образом, полупроводниковые нанокристаллы CdSe/ZnS с пассивирующей пленкой из молекул меркаптоундекановой кислоты, тиогликолевой кислоты и цистеина могут быть использованы для визуализации живых клеток. Качество окраски клеток значительно зависит от способа приготовления окрашивающих растворов и концентрации наночастиц в инкубационной среде. Показано, что морфологическая картина поглощения опухолевыми клетками наночастиц зависит от конструкции последних. Цитотоксического эффекта исследованных модификаций наночастиц не выявлено.

Перспективы развития технологии

Актуальность разработки обусловлена необходимостью совершенствования клинической диагностики для раннего определения сахарного диабета, рака и других заболеваний. Для обеспечения высокой специфичности связывания нанобиомаркеров с диагностируемыми антигенами реализована схема иммунолюминесцентного анализа (рис. 12), основанная на применении системы антиген—антитело [11]. Схема процесса подразумевает нанесение на полупроводниковые частицы (на финишном этапе) белкового покрытия. В качестве белкового покрытия выступают антитела. Уникальные оптические свойства нанобиомаркеров сохраняются. На рис. 13 (см. четвертую сторону обложки) представлена блок-схема нанобиоинформационной системы. На схеме показаны: рабочие места для получения нанокристаллов (1) и оценки их оптических свойств (2); рентгеноструктурный спектр нанокристаллов (3); схема наночастицы, подготовленной для работы в физиологических растворах (4); схемы технологических приемов формирования систем антиген—антитело для высокоспецифического определения ис-

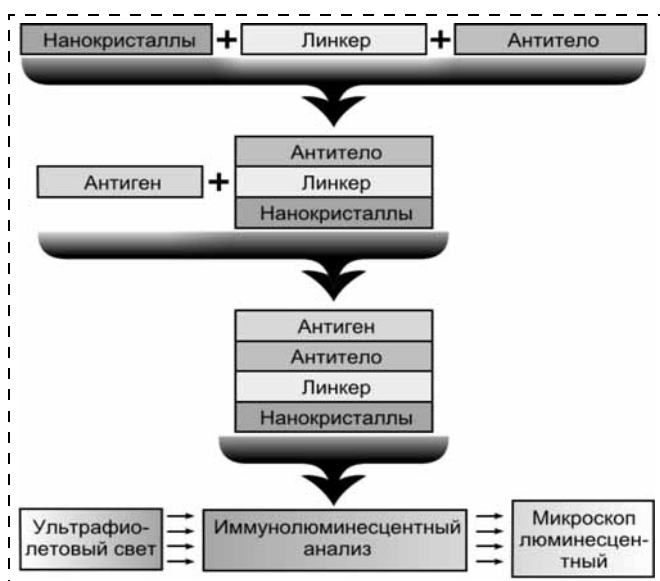


Рис. 12. Схема иммунолюминесцентного анализа с использованием полупроводниковых нанобиомаркеров (система антиген/антитело)

комых антигенов (5, 6); микрофотография биологических клеток, детектируемых с помощью люминесцирующих нанокристаллов (7); врач, изучающий результаты анализов пациента (8).

Заключение

Разработан ряд модификаций полупроводниковых наночастиц CdSe/ZnS с пассивирующей пленкой различного состава (из молекул меркаптоундекановой кислоты, тиогликолевой кислоты и цистеина), пригодных для визуализации живых клеток, и методика прижизненной окраски последних. Результаты визуализации продемонстрированы на опухолевых клетках мышей: асцитной карциномы Эрлиха и асцитной гепатомы 22a. Не выявлено цитотоксического эффекта наночастиц в течение 5-часовой инкубации. Наблюдаются различия в морфологической картине поглощения опухолевыми клетками нанокристаллов с различным пассивирующим покрытием, что, вероятно, является отражением различий в механизмах поглощения этих частиц. Результаты свидетельствуют о возможности применения исследованных полупроводниковых наночастиц для изучения закономерностей поглощения клетками нанообъектов различного размера и конструкции.

Авторы благодарят доктора химических наук М. В. Артемьева за любезно представленные образцы наночастиц.

Список литературы

1. Яшин К. Д., Осипович В. С., Пицук С. Е. Люминесцентные полупроводниковые наночастицы // Нано- и микросистемная техника. 2007. № 5. С. 70—74.
2. Яшин К. Д., Осипович В. С., Пицук С. Е. Получение наночастиц // Нано- и микросистемная техника. 2007. № 6. С. 2—6.
3. Яшин К. Д., Осипович В. С., Кульчицкий В. А. и др. Нано-биополупроводниковая система визуализации клеток // Нано- и микросистемная техника. 2008. № 12. С. 48—52.
4. Aldana J., Wang Y. A., Peng X. Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols // J. Am. Chem. Soc. 2001. Vol. 123. P. 8844—8850.
5. Zhang Y., Chen Y., Westerhoff P., et al. Stability and removal of water soluble CdSe quantum dots in water // Environ. Sci. Technol. 2008. Jan 1.
6. Etxeberriall E., Gonzalez P., Baroja-Fernandez E., et al. Fluid Phase Endocytic Uptake of Artificial Nano-Spheres and Fluorescent Quantum Dots by Sycamore Cultured Cells // Plant Signaling & Behavior. 2006. Vol. 1, N 4. P. 196—200.
7. Hansen C. G., Nichols B. J. Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis // Journal of Cell Science. 2009. Vol. 122, N 11. P. 1713—1721.
8. Sukhanova A., Devy J., Venteo L., et al. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells // Analytical Biochemistry. 2004. Vol. 324, N 1. P. 60—67.
9. Яшин К. Д., Осипович В. С., Пицук С. Е. Структура нанокристаллов селенида кадмия, полученных методами коллоидной химии для применения в медицинской диагностике // Доклады БГУИР. 2007. № 3 (19). С. 74—79.
10. Яшин К. Д., Осипович В. С., Терпинская Т. И. и др. Технология визуализации клеток для экологической токсикологии // Здоровье и окружающая среда: сб. научных трудов. Минск: Белинформ. 2009. Вып. 13. С. 521—526.
11. Ostendorp S., Lei Y., Wilde G. Two-step synthesis method for regular arrays of nano-particles embedded in oxide layers // Chemical Physics Letters. 2011. Vol. 513. P. 99—102.