

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 616-008.9-073

ВИКОРИСТАННЯ НАПІВМАГНІТНИХ НАПІВПРОВІДНИКОВИХ НАНОЧАСТИНОК ДЛЯ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ СТРУКТУР БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИН

В. І. Федів¹, І. С. Давиденко¹, А. Й. Савчук², М. М. Марченко², Т. А. Савчук²

¹Буковинський державний медичний університет,
Кобилянська 42, Чернівці, 58000, тел.. 8-0372-524544

²Чернівецький національний університет ім.Ю.Федьковича
Коцюбинського 2, Чернівці, Україна, 58012, тел.. 8-0372-584755
e-mail: vfediv@mail.ru, savchuk@chnu.cv.ua

ВИКОРИСТАННЯ НАПІВМАГНІТНИХ НАПІВПРОВІДНИКОВИХ НАНОЧАСТИНОК ДЛЯ ВІЗУАЛІЗАЦІЇ СТРУКТУР БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИН

В. І. Федів, І. С. Давиденко, А. Й. Савчук, М. М. Марченко, Т. А. Савчук

Анотація. При оптимальних умовах синтезу отримано комплекс наночастинка напівмагнітного напівпровідника CdMnS — меркаптоетанол. Утворення наночастинок проконтрольовано оптичними методами. Виявлено незалежність розмірів наночастинок від концентрації вихідних компонент у діапазоні $5 \cdot 10^{-4}$ — $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Деякі структури біологічних тканин виявлені селективною люмінесцентною візуалізацією з використанням наночастинок на прикладі досліджень гістологічних зрізів плацентарної тканини.

Ключові слова: наночастинка, напівмагнітний напівпровідник, люмінесценція, біологічна тканина, біосенсор

APPLICATION OF SEMIMAGNETIC SEMICONDUCTOR NANOPARTICLES FOR VISUALISATION OF BIOLOGICAL TISSUE STRUCTURES

V. I. Fediv, I. S. Davydenko, A. I. Savchuk, M. M. Marchenko, T. A. Savchuk

Abstract. Complex type of semimagnetic semiconductor nanoparticle CdMnS — mercaptoethanol has been obtained at optimum synthesis conditions. Formation of nanoparticles was monitored by optical methods. It is shown independence of the size nanoparticles from concentration initial a component in a range of $5 \cdot 10^{-4}$ — $5 \cdot 10^{-2}$ mol/L. Some structures of biological tissue were revealed on selective luminescent visualisation of the synthesized nanoparticles by applying to study of histological section of a placental tissue.

Keywords: nanoparticle, semimagnetic semiconductor, luminescence, biological tissue, biosensor

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУМАГНИТНЫХ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ СТРУКТУР БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

В. И. Федив, И. С. Давыденко, А. Й. Савчук, М. М. Марченко, Т. А. Савчук

Аннотация. При оптимальных условиях синтеза получено комплекс наночастица полумагнитного полупроводника CdMnS — меркаптоэтанол. Оптическими методами проконтролировано формирование наночастиц. Показано независимость размеров наночастиц от концентрации исходных компонент в диапазоне $5 \cdot 10^{-4}$ — $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Некоторые структуры биологических тканей выявлены селективной люминесцентной визуализацией с помощью наночастиц, на примере исследований гистологических срезов плацентарной ткани.

Ключевые слова: наночастица, полумагнитный полупроводник, люминесценция, биологическая ткань, биосенсор

Вступ

Неорганічні наночастинки, виготовлені з різних матеріалів, є важливими складовими для утворення різноманітних функціональних надструктур. Розміри їх можуть перебувати у межах одиниць — сотень нанометрів. Наночастинки у своєму складі містять метали, оксиди металів, напівпровідникові матеріали (Ag_2S , CdS , CdSe , TiO_2 і т.п.) і наділені специфічними оптичними й електронними властивостями, які залежать від їх розмірів, форми, складу та мають передбачуваний характер.

Розміри субклітинних структур співрозмірні з розмірами наночастинок, що спонукає до використання їх як нанозондів, які дозволяють проводити дослідження на клітинному рівні [1, 2]. Найчастіше з цією метою використовують такі неорганічні наночастинки, як Au , Ag , CdS , ZnS , CdSe/ZnS , GaAs , InP , CdSe/CdS/SiO_2 .

Одним із чутливих методів дослідження біологічних об'єктів є флуоресцентний аналіз, який передбачає використання органічних флуорофорів, які характеризуються слабкою фотостабільністю, вузьким спектром поглинання та широким емісійним спектром. Напівпровідникові наночастинки є сучасним і перспективним класом флуорофорів для візуалізації структур фіксованих клітин і тканин, живих клітин та для відображення динаміки клітинних процесів [3–5].

Дослідження показали, що напівпровідникові квантові точки мають значні переваги над стандартними фарбуючими речовинами, а саме: збуджуються широким спектром довжин хвиль, що дозволяє при одному джерелі збудження отримувати різні емісійні спектри; наділені значною фотостабільністю; їх емісійні

спектри, які регулюються розміром і складом, є вузькими та симетричними; мають мінімальну інтерференцію від натуральних автофлуоресцентних частинок, є біосумісними. Важливою властивістю імунофлуоресценції є мала кількість квантових точок необхідних для подачі сигналу [3,6,7].

Біосумісність квантових точок знаходить використання не тільки як базовий інструмент біоміток, але й як ключовий елемент багатофункціональних комплексів для біопроб. Велика площа їх поверхні може зумовлювати виникнення зв'язків із лікарською молекулою та молекулою-мішенню, що дозволяє направлено доставляти медикаменти до уражених органів.

Використання напівпровідникових наночастинок у візуалізації біологічних об'єктів має обмеження, пов'язані з отриманням біосумісних нанокристалів. Зокрема, різка зміна умов часто призводить до деградації та дезактивації чутливих біологічних компонентів, а також обмінні реакції на поверхні наночастинок утруднюють формування стабільних біокон'югатів. Крім того, утворення стехіометрично визначених комплексів наночастинка-біомолекула є проблемним. Водночас обмінні реакції змінюють хімічний та фізичний стан поверхневих атомів наночастинок, що в багатьох випадках зменшує квантовий вихід люмінесценції наночастинок, а також призводить до перетворень, які сприяють їх агрегації та осадженню [1,8].

Пошук альтернативних методів синтезу біосумісних наночастинок, що усувають зазначені недоліки, є актуальним.

Мета дослідження — обґрунтувати можливість використання напівмагнітних напів-

провідникових наночастинок (НМН) CdMnS у селективній люмінесцентній візуалізації структур фіксованих біологічних тканин.

Матеріали і методи

Синтез НМН наночастинок здійснювався у багатокомпонентній системі $\text{CdCl}_2\text{-MnCl}_2\text{-Na}_2\text{S-H}_2\text{O}$, меркаптоетанол. Теоретичний розрахунок ймовірності перебігу хімічних реакцій у багатокомпонентній системі $\text{Cd}^{2+}\text{-Mn}^{2+}\text{-S}^{2-}\text{-H}_2\text{O}$ при синтезі колоїдних наночастинок дозволив встановити оптимальні умови синтезу. Враховуючи діаграми розподілу іонних і молекулярних форм Кадмію, Мангану та Сульфору залежно від концентрації солей та рН середовища, графіки залежностей рН початку утворення осадів гідрооксидів і сульфідів Кадмію та Мангану від концентрації солей, границі кінетичної та термодинамічної стійкості осадів сульфідів, визначено оптимальні діапазони молярної концентрації вихідних компонентів і величини рН середовища для синтезу методом адсорбційного легування у процесі росту наночастинок $\text{Cd}_{1-x}\text{Mn}_x\text{S}$. З'ясовано, що оптимальними концентраціями солей є концентрації (10^{-4} — 10^{-2}) моль/л, а оптимальні значення рН середовища змінюються в межах 3 — 5.

Хімічний синтез наночастинок у водному середовищі проводився у присутності стабілізуючих агентів, які зв'язуються з поверхневими атомами наночастинок, що, в свою чергу, призводить до стабілізації та перешкоджає неконтрольованому росту й агрегації наночастинок.

Наночастинки $\text{Cd}_{1-x}\text{Mn}_x\text{S}$ синтезували у водному середовищі при кімнатній температурі [9]. Концентрації вихідних компонентів і величина рН середовища утримувалися в межах розрахованої діаграми. Як пасивуючий агент використовувався меркаптоетанол.

Оптичний моніторинг утворення наночастинок контролювався поетапним вимірюванням спектру поглинання залежно від концентрації вихідних компонент у діапазоні (10^{-4} – 10^{-2}) моль/л. Дослідження оптичного поглинання проводилося з допомогою монохроматора МДР-23 у діапазоні довжин хвиль 200–2200 нм, джерела випромінювання — лампа ДДС-30, фотопоможувача.

Методика люмінесцентної візуалізації структур біологічних тканин апробована на гістологічних препаратах плаценти людини тер-

міном вагітності 40 тижнів. Плацента обрана за об'єкт дослідження тому, що має такі структури хоріального дерева, які порівняно легко ідентифікувати.

Застосовували спосіб обробки плацентарної тканини, який мінімально змінює її хімічні та структурні властивості, зокрема, дозволяє зберегти придатними для виявлення більшості антигенів [10] та сульфгідрильних груп білкових молекул із можливістю їх тривалої консервації у парафінових блоках. Основні принципи зазначеного способу обробки тканини полягають у: 1) фіксації тканини, у забуференому за Ліллі фосфатним буфером (рН=7,0), 10%-му розчині формаліну впродовж 22 годин (триваліший час обробки у формаліні призводить до артефактів структури більшості антигенів), 2) прискореному зневодненню у висхідній батареї спиртів, 3) просочуванні у парафіні при температурі 58°C (вищі значення температури можуть викликати небажані зміни структури антигенів). Гістологічні зрізи 5 мкм завтовшки отримували за допомогою санного мікротому MC-2. Всі подані результати досліджень відносяться виключно до вищезазначеної обробки плацентарної тканини.

Дослідження виконувались із використанням мікроскопа ЛЮМАМ-Р-8, цифрової фотокамери Olympus C740UZ, люмінесцентного об'єктиву Л40^x.

Результати та їх обговорення

На рис. 1 представлена спектральна залежність оптичної густини колоїдів наночастинок $\text{Cd}_{1-x}\text{Mn}_x\text{S}$ у динаміці їх росту при зміні кількості вихідних компонент у розчині. Екситонна структура (показана стрілкою) на представленій залежності свідчить про вузький розподіл за розмірами синтезованих наночастинок. Відсутність зсуву екситонної лінії є доказом незалежності розмірів синтезованих наночастинок від концентрації вихідних компонент у діапазоні $5 \cdot 10^{-4}$ — $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Зростання оптичної густини колоїду із ростом концентрації солей, свідчить про зростання концентрації наночастинок.

На рис. 2 відображено фотолюмінесцентне зображення деяких структур хоріального дерева плаценти, отриманого після обробки наночастинами гістологічних препаратів плаценти людини терміном вагітності 40 тижнів.

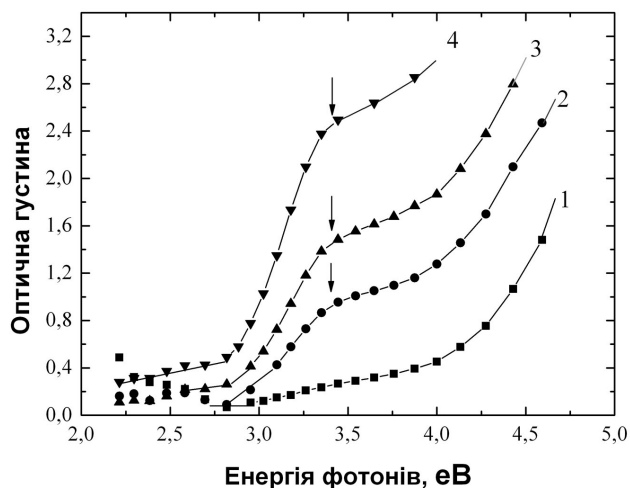


Рис. 1. Спектральна залежність оптичної густини колоїдів; 1 — матриця (розчин меркаптоетанолу); 2,3,4 — колоїди наночастинок $\text{Cd}_{1-x}\text{Mn}_x\text{S}$ при різній кількості прекурсора Na_2S у розчині, відповідно $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $9 \cdot 10^{-3}$ моль/л

Інтенсивніше світіння спостерігалось у материнських еритроцитах та еритроцитах плода

(рис.2а-г), а також в інтервільозному (міжворсинчастому) фібриноїді (рис.2г). Менш інтенсивне, але все ж чітке світіння відзначено в синцитіотрофобласті та ендотеліоцитах кровоносних судин хоріальних ворсин (рис.2а-в). Найменш інтенсивне світіння зафіксоване у дрібних об'єктах строми хоріальних ворсин, які з урахуванням розмірів, форми та особливостей розташування попередньо ідентифіковані як стромальні клітини (найвірогідніше, з урахуванням терміну вагітності, — фібробласти). Спектральний діапазон зображення знаходився в області зеленого кольору (біля 500nm).

Експерименти з цифровою фотозйомкою люмінесцентних зображень при різних витримках (за інших рівних умов експозиції) дозволили виявити, що світіння еритроцитів зумовлено світінням їх оболонки (рис.2а-в), а сприйняття того, що світиться еритроцитарна цитоплазма є наслідком розсіювання світла.

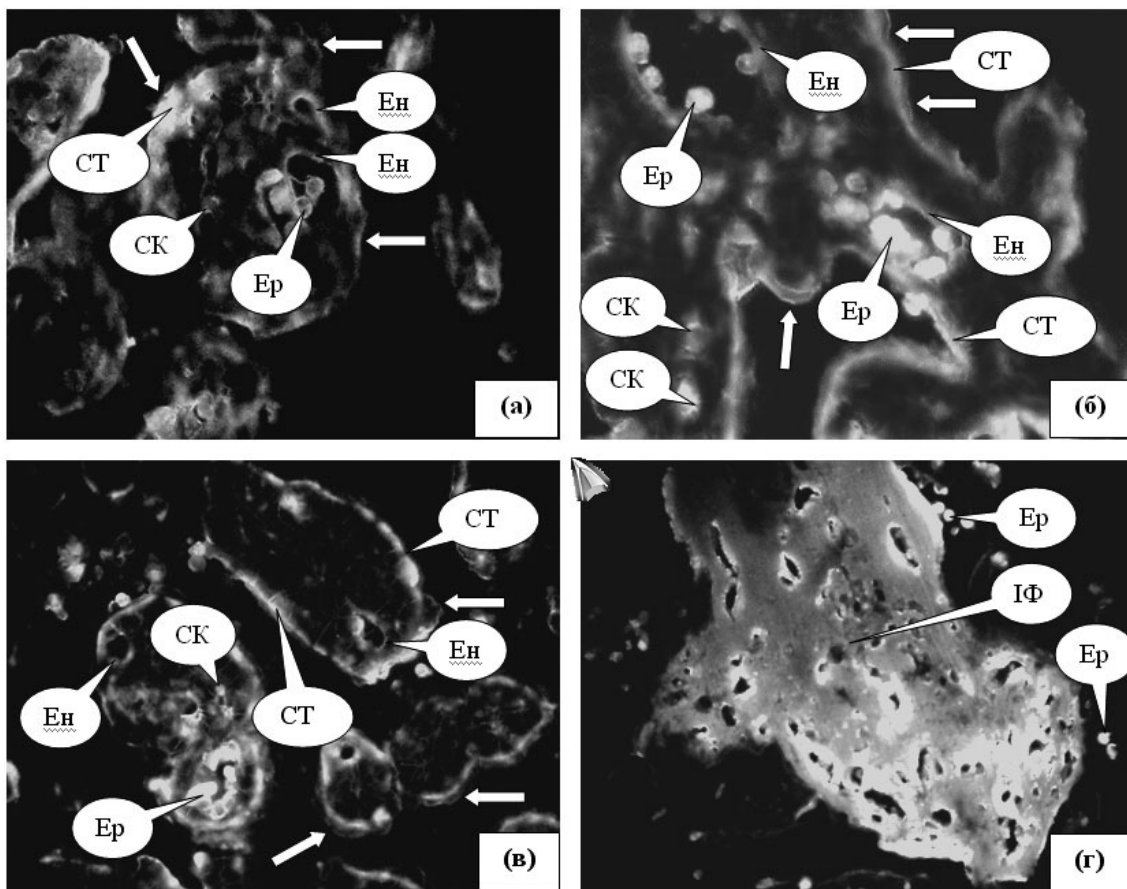


Рис. 2. Люмінесценція структур плаценти після обробки наночастинами. Позначення. Ер — еритроцити, СТ — синцитіотрофобласт, Ен — ендотеліоцити, СК — стромальні клітини, ІФ — інтервільозний фібриноїд. Стрілки вказують на місця тонкої смужки жовто-золотистого забарвлення (пояснення у тексті). а-б) Об.Л40^x, Ок.15^x; в-г) Об.Л40^x, Ок.7^x.

У інтервільозному фібриноїді спостерігалося світіння різної інтенсивності, в якому відзначена певна закономірність, що особливо простежувалась у каналізованому фібриноїді. Найінтенсивніше світилися ділянки, де за імуногістохімічними даними концентруються адгезивні молекули, зокрема, інтегрин- α -X- β 2 (CD11c/ CD18) [11]. Йдеться про поверхню фібриноїду та його поліморфні канали, де відзначалася тонка світла смужка з високою інтенсивністю світіння (рис.2г), яке відрізнялося за спектром від інших ділянок фібриноїду — мало жовто-золотисте забарвлення. Для усунення суб'єктивності в оцінці кольору забарвлення здійснено спектральний комп'ютерний аналіз ділянок зображення у системі RGB. Аналогічне світіння у вигляді тонкої смужки відзначалося й на поверхні синцитіотрофобласта (рис.2а-в — вказано білими стрілками), що також відповідає імуногістохімічному розташуванню згаданого інтегрину-альфа-Х-бета2 [11].

Світіння синцитіотрофобласта було нерівномірним як за периметром кожної хоріальної ворсини, так і за глибиною трофобластичного покриву, що, очевидно, пояснюється зміною концентрації різних речовин і є нормою для даної структури [12]. Водночас для всіх хоріальних ворсин відзначена закономірність, яка полягає у тому, що світіння синцитіотрофобласта завжди було сильнішим у базальних (рис.2а-в), ніж апікальних відділах (за винятком самої поверхні трофобласта, що зазначено вище).

Світіння ендотелію кровоносних судин хоріальних ворсин у порівнянні з синцитіотрофобластом відрізнялося більшою стабільністю по перерізу судини (рис.2а,в). Особливо добре будову ендотелію було видно у судинах, які не містили еритроцитів (рис.2а). Розрив між ендотеліоцитами не відзначено. Це пояснюється тим, що вивчалися плаценти з фізіологічним перебігом вагітності. За патологічного перебігу вагітності з'являються розриви між ендотеліоцитами, які вдається діагностувати даною люмінесцентною методикою, тобто методика може бути застосована як діагностична процедура щодо ушкодження ендотеліального покриву кровоносних судин.

Слід зазначити, що світіння низки структур, які є обов'язковими елементами хоріальних ворсин не виявлялися. Зокрема, вказане стосується основної речовини та волокон сполучної тканини, субепітеліальної та субендотеліальної базальних мембран, які не візу-

алізувалися у вивчених гістологічних зрізах хоріальних ворсин плаценти.

Ідентифікацію мікроскопічних структур плаценти здійснювали з урахуванням сучасних уявлень про будову хоріальних ворсин і позаворсинкових структур цього органа у термін вагітності 40 тижнів [12]. Для порівняння на рис.3 відображений гістологічний зріз плаценти із забарвленням гематоксиліном та еозином, що найчастіше використовується в гістологічній практиці.

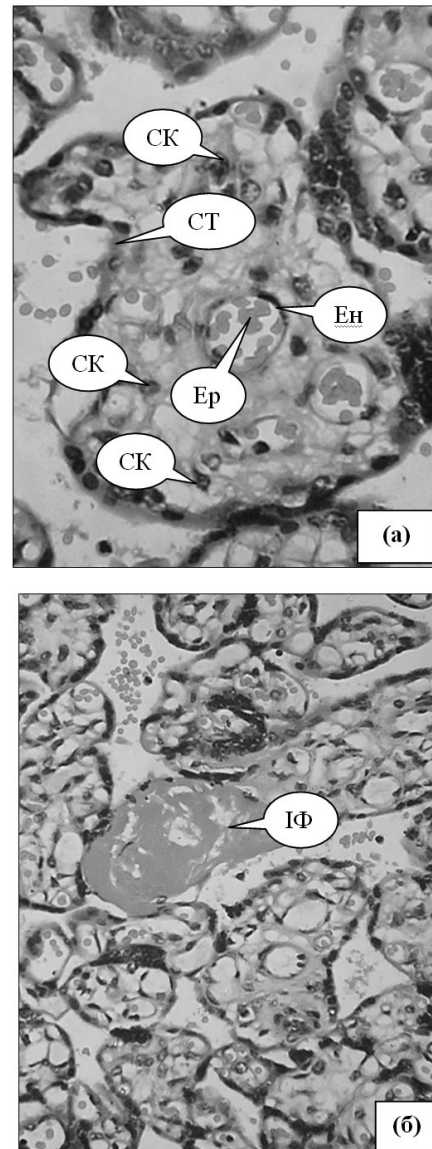


Рис. 3. Вигляд гістологічних зрізів плаценти при забарвленні гістологічних зрізів гематоксиліном та еозином. а) ділянка зображення гістологічного зрізу для ілюстрації структур хоріальної ворсини на поперечному розрізі. *Позначення.* Ер — еритроцити, СТ — синцитіотрофобласт, Ен — ендотеліоцити, СК — стромальні клітини. Об.40 $\times$, Ок.15 $\times$. б) ділянка зображення гістологічного зрізу для ілюстрації інтервільозного фібриноїду (ІФ). Об.40 $\times$, Ок.7 $\times$.

Щодо природи зв'язків наночастинок із компонентами тканини плаценти можна допускати фізичну взаємодію (наприклад, відповідність розмірів наночастинок розмірам “отворів”, “заглибин” чи “щілин” біологічної тканини) або хімічні зв'язки, при цьому вони можуть бути зумовлені, як властивостями наночастинок, так і пасивуючого агента.

Меркаптогрупи зв'язуються з атомами Cd, а полярні гідроксильні групи допомагають комплексу бути добре розчинним у воді. Вільні гідроксильні групи також доступні для ковалентних зв'язків з різними біомолекулами внаслідок утворення міжмолекулярних зв'язків з реактивними аміногрупами.

Встановлено, що нанокристали прикріплюються переважно до адсорбуючих молекул, що підкреслює можливість селективного прикріплення наночастинок, регулюючи властивостями пасивуючих агентів і специфічних характеристик молекул.

Висновки

1. Виявлена незалежність розмірів наночастинок від концентрації вихідних компонент у діапазоні $5 \cdot 10^{-4}$ — $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

2. Запропонована люмінесцентна методика з використанням наночастинок дозволяє диференційовано визначати структури біологічної тканини у гістологічних зрізах (на прикладі тканини плаценти), що проявляється як у різній інтенсивності, так і в різному спектрі світіння.

3. Перспектива подальших досліджень полягає у детальному вивченні співвідношення між характеристиками світіння та патологічними змінами тканини, визначенні природи зв'язків різних структур біологічних тканин із наночастинами, у тому, числі при зміні їх оптичних властивостей внаслідок зміни їх розмірів або складу.

Література

1. *Christof M.* Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2001. — Vol.40. — P.4128 — 4158.
2. *Salata O.V.* Applications of nanoparticles in biology and medicine // *J.of Nanobiotechnology.* — 2004. — Vol.2:3.
3. *Liang Zhu, Simon Ang, Wen-Tso Liu* Quantum Dots as a Novel Immunofluorescent Detection System for *Cryptosporidium parvum* i *Giardia lamblia* // *Appl Environ Microbiol.* — 2004. — Vol.70(1). — P.597–598.
4. *Smith A.M., Xiaohu Gao, Shuming Nie* Quantum dot nanocrystals for in vivo molecular and cellular imaging // *Photochemistry and Photobiology.* — 2004. — Vol.80. — P. 377–385.
5. *Andy Watson, Xingyong Wu, and Marcel Bruchez* Lighting Up Cells with Quantum Dots // *BioTechniques.* — 2003. — Vol. 34, №2. — P.296–303.
6. *Alivisatos P.* The use of nanocrystals in biological detection // *Nature Biotechnology.* — 2004. — Vol.22. — P.47 — 52.
7. *Michalet X., Pinaud F. F., Bentolila L. A., Tsay J. M., Doose S., Li J. J., Sundaresan G., Wu A. M., Gambhir S. S., and Weiss S.* Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics // *Science.* — 2005. — Vol.307, №5709. — P.538–544.
8. *William W. Yu., Emmanuel Chang, Rebekah Drezek, Vicki L. Colvin* Water-soluble quantum dots for biomedical applications // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* — 2006. — Vol.348. — P.781–786.
9. *Savchuk A., Fediv V.I., Voloshchuk A.G., Savchuk T.A., Bacherikov Yu. Yu., Perrone A.* New Approach to Synthesis of Semimagnetic Semiconductor Nanoparticles // *Materials Science and Engineering.* — 2006. — Vol. C26. — P.809–812.
10. *Эллиниди В.Н., Анисеева Н.В., Максимова Н. А.* Практическая иммуногистоцитохимия (методические рекомендации). — СПб.: 2002. — 38с.
11. *Давиденко І.С.* Експресія CD11с в структурах плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних // *Буковинський медичний вісник.* — 2004. — Т.8, №3–4. — С.155–158.
12. *Benirschke K., Kaufmann P. Baergen R.N.* Pathology of the human placenta. — New York: Springer. 5th ed.— 2006. — 1070 p.