

Nanocząstki jako luminescencyjne znaczniki biologiczne

*Jakub Cichos, Mirosław Karbowski**

Szybki rozwój nauk biologicznych wymaga ciągłego udoskonalania technik analitycznych, bez których nie możliwe byłoby m.in. dokładniejsze poznanie mechanizmów rządzących życiem na poziomie komórkowym czy opracowanie czułych i uniwersalnych testów immunoenzymatycznych.

Stosowane obecnie w roli znaczników barwniki organiczne wykazują wprawdzie doskonałe własności optyczne, tj. wysokie wydajności kwantowe emisji czy łatwość chemicznej modyfikacji i przyłączenia do poszczególnych typów cząsteczek biologicznych, jednakże charakteryzują się także szeregiem wad, wśród których wymienić należy szerokie pasma emisji, wąskie pasma wzbudzenia oraz podatność na fotodegradację, czy małe przesunięcia Stokesa [1]. Ponadto do ich wzbudzenia wymagane jest często promieniowanie z zakresu UV, które wzbudza jednocześnie naturalnie występujące w organizmach żywych fluorofory takie jak flawiny, porfiryny czy aminokwasy aromatyczne, co prowadzi do zjawiska autofluorescencji wpływającego niekorzystnie na parametry pomiaru wskutek zmniejszania stosunku sygnału do szumu. Ze względu na krótkie czasy zaniku fluorescencji znaczników organicznych utrudnione jest rozdzielenie ich sygnałów od tych pochodzących od fluoroforów naturalnie występujących w żywych orga-

nizmach [2]. Wydłużona ekspozycja na promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu UV, powoduje nie tylko niszczenie barwnika ale również śmierć komórek, uniemożliwiając długie obserwacje żywych obiektów [3].

W związku z powyższym uzasadnione są usilne poszukiwania nowych materiałów luminescencyjnych charakteryzujących się rozmiarami z zakresu pojedynczych nanometrów (wielkość cząsteczek występujących naturalnie w organizmach żywych) jednak pozbawionych wad barwników organicznych. Wśród najczęściej badanych układów znajdują się półprzewodnikowe kropki kwantowe (QDs) oraz nanocząstki (NC) domieszkowane jonami pierwiastków ziem rzadkich.

W obu przypadkach najbardziej skuteczne metody syntezy opierają się na reakcji odpowiednich prekursorów prowadzonej w wysokowrzących rozpuszczalnikach organicznych, a powstałe produkty tworzą stabilne roztwory koloidalne w rozpuszczalnikach niepolarnych. Hydrofobowy charakter produktów

syntezy wymusza konieczność odpowiedniej modyfikacji powierzchni, która będzie prowadzić do uzyskania trwałych roztworów koloidalnych w warunkach fizjologicznych, umożliwi dalszą funkcjonalizację oraz ograniczy potencjalną toksyczność.

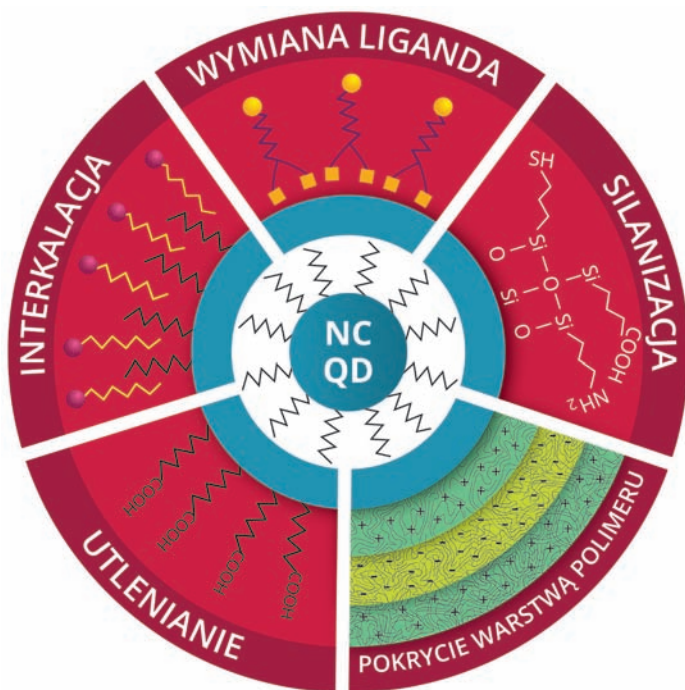
Kropki kwantowe

QDs, których właściwości spektroskopowe są ściśle uzależnione od rozmiarów, stanowią bardzo dobrą alternatywę dla barwników organicznych. Wysoka wydajność kwantowa emisji, duże rozsunięcie pasm absorpcji i emisji dającej się ponadto modulować rozmiarem i składem kropek oraz stosunkowo wysoka stabilność fizykochemiczna stanowią o ich znacznej przewadze względem znaczników organicznych. QDs wykazują ponadto bardzo szerokie pasma absorpcji w zakresie UV/VIS pozwalające na wzbudzenie różnych rodzajów QDs za pomocą promieniowania o tej samej długości fali. Stosunkowo wąskie pasma emisji pozwalają na jednoczesne dokładne oznaczenie kilku analitów w jednej próbce, co znacznie

trudniej uzyskać w przypadku barwników organicznych. Wykazano, że stosując 6 rodzajów QDs o różnych barwach i intensywnościach emisji istnieje możliwość jednoczesnego oznaczenia od 10000 do 40000 różnych molekuł w jednej próbce [4].

QDs wykazują ponadto ogromną stabilność podczas długiego naświetlania, w odróżnieniu od fluoroforów organicznych, które już po kilku minutach tracą znaczną część swojej intensywności. Wykazano, że zmodyfikowane kwasem dihidroliponowym CdSe/ZnS charakteryzują się 100 krotnie większą stabilnością i 20 krotnie większą intensywnością niż rodamina 6G [5].

Obecny stan wiedzy pozwala na syntezowanie QDs charakteryzujących się wąskim rozkładem wielkości w zakresie pojedynczych nanometrów [6]. W celu zwiększenia wydajności kwantowej i stabilności najczęściej pokrywa się rdzenie (np. CdS, CdSe, InP) warstwą półprzewodnika (np. ZnS) o większej przerwie energetycznej w porównaniu z przerwą energetyczną materiału kropek [7], [8], [9]. Niemniej



Rys. 1. Najpopularniejsze strategie funkcjonalizacji nano-cząsteczek

jednak w celu rozproszenia QDs w środowisku fizjologicznym (roztworach biologicznych) wymagana jest dodatkowa modyfikacja powierzchni. Najprostsze metody polegają na wymianie pierwotnego liganda organicznego na warstwę liganda hydrofilowego, co może jednak znacząco wpływać na oryginalne właściwości spektroskopowe QDs [10]. Często ligandy składają się z trzech segmentów: kotwicy, hydrofilowego łańcucha oraz terminalnej grupy funkcyjnej pozwalającej na przyłączenie aktywnej biologicznie molekuly. W roli hydrofilowego łańcucha wykorzystywany jest powszechnie glikol polietylenowy, który poza zwią-

zeniem stabilności QDs w roztworze wodnym zmniejsza także oddziaływania niespecyficzne [11]. Te i inne metody funkcjonalizacji przedstawiono schematycznie na rys. 1. Wyniki wielu badań ujawniły jednak znaczną toksyczność QDs. Wykazano ich wpływ zarówno na wzrost jak i przeżywalność komórek, w zależności od składu, wielkości, metody syntezy i rodzaju ligandów powierzchniowych. Postulowane są różne mechanizmy toksyczności, związane m.in. z tworzeniem wolnych rodników, desorpcją jonów Cd^{2+} czy oddziaływaniem z organellami komórkowymi zaburzającym ich poprawne działanie [11].



Wypożyczenie laboratoriów 2000 wyrobów najwyższej jakości 40 lat doświadczenia w analityce

- Certyfikowane materiały referencyjne CRM
- Szlifierki i szlifierko-polerki
- Spektrometry iskrowe
- Prasy i matryce
- Wyroby laboratoryjne z metali szlachetnych
- Materiały eksploatacyjne do metalografii
- Akcesoria do XRF
- Próbniki do pobierania próbek



METIMEX® Laboratory Equipment dr inż. Jerzy Springer

ul. Wojska Polskiego 9/2, 44-120 PYSKOWICE; tel./fax: +48 32 2332472, www.metimex.com.pl, biuro@metimex.com.pl

Nanocząstki domieszkowane jonami lantanowców

Kolejną grupą nanocząstek branych pod uwagę jako znaczniki komórkowe stanowią nanocząstki domieszkowanie jonami lantanowców. Wśród nich, ze względu na bardzo dobre właściwości optyczne i chemiczne, na szczególną uwagę zasługują fluorki typu NaLnF_4 domieszkowane parą jonów Yb^{3+} i Er^{3+} , Yb^{3+} i Tm^{3+} lub Yb^{3+} i Ho^{3+} . W odróżnieniu do omawianych wcześniej barwników organicznych i QDs wykazują one zjawisko *anawersji*, czyli konwersji energii w górę (z ang. *upconversion*) polegające na tym, że absorpcja dwóch lub więcej niż energii fotonów (np. z zakresu podczerwonego) prowadzi do emisji fotonów wyżej energetycznych, z zakresu widzialnego lub ultrafioletowego. Różnica ta daje istotną przewagę nanocząstkom anawertującym (UCNPs, z ang. *upconverting nanoparticles*) podczas obrazowania *in vivo* i *in vitro*. Tkanki żywych organizmów są najbardziej przezroczyste w zakresie okna terapeutycznego [12], [13] położonego w zakresie bliskiej podczerwieni (750-1000 nm). Zgodnie z prawem rozpraszania Mie [14] im krótsza długość fali tym większy stopień rozpraszania promieniowania, z tego względu stosując promieniowanie z zakresu podczerwieni można wnikać do znacznie głębiej położonych części organizmu, niż w przypadku fal krótszych. Również absorpcja składników organizmu takich jak hemoglobina, utlenowana hemoglobina, melamina czy woda osiąga wartości naj-

Tabela 1. Porównanie niektórych właściwości fizykochemicznych różnych związków wykorzystywanych do znakowania biologicznego

Cecha	Barwnik organiczny	Kropki kwantowe	Nanocząstki domieszkowane jonami lantanowców
Szerokość pasm absorpcji i emisji	ok. 50-80 nm	bardzo szerokie pasma absorpcji, stosunkowo wąskie pasma emisji (30-90 nm)	zarówno pasma emisji jak i absorpcji bardzo wąskie <20 nm
Czasy zaniku luminescencji	~ 1 ns	~ 10-100 ns	~ 0.1-5 ms
Przesunięcie Stokesa	<50 nm	<50 nm	nawet do 500 nm, zarówno w procesie konwersji energii w górę jak i w dół
Rozmiar	<5 nm	1-60 nm; właściwości fizykochemiczne zależą od rozmiaru	>5 nm; zwykle 10-30 nm
Absorpcja	UV/Vis	UV/Vis, NIR	UV/Vis, NIR
Emisja	Vis	Vis, NIR	Vis, NIR
Stabilność fotochemiczna	Mała	duża; bez większych zmian nawet podczas dłuższych naświetlań, problem niebieszczenia i migotania	bardzo duża, brak zmian nawet podczas długoterminowego naświetlania laserem
Toksyczność	od małej do bardzo dużej	nie do końca zbadana, obecność metali ciężkich wymaga bardzo dobrego odizolowania od otoczenia	nie do końca zbadana, dotychczasowe wyniki przemawiają raczej za niskim poziomem

mniej w zakresie od około 700 do 1100 nm. Oczywiście, można znaleźć przykłady QDs, takich jak PbS , PbSe czy Ag_2S , posiadających zarówno pasma absorpcji i emisji w zakresie podczerwonym, jednakże wartości wydajności kwantowej takich związków są bardzo niskie, a ponadto detektory na podczerwień, w odróżnieniu od tych czułych na zakres UV-VIS, są ciągle stosunkowo rzadkie w laboratoriach diagnostycznych. Jednak pełne wykorzystanie zalet nanocząstek domieszkowanych jonami lantanowców również wymaga modyfikacji powierzchni, analogicznie jak w przypadku kropek kwantowych.

Silanizacja powierzchni nanocząstek

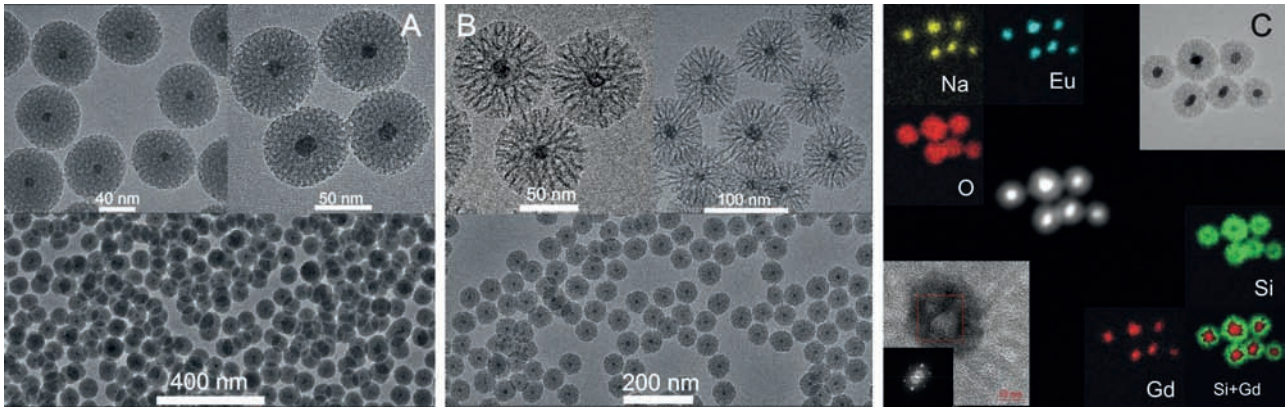
Wśród najbardziej obiecujących metod modyfikacji powierzchni nanocząstek wymieniłem na leży silanizację powierzchni.

Opisane dotychczas metody pokrywania warstwą SiO_2 można podzielić na dwie grupy. Pierwsza z nich obejmuje wszystkie metody oparte na opisanej przez Stöbera metodzie zol-żel [15]. Wymaga ona jednak wstępnego rozproszenia nanocząstek w środowisku wodno-alkoholowym, a otrzymane nanocząstki rzadko mają rozmiary mniejsze niż 100-200 nm. Do drugiej grupy należą metody oparte na mikroemulsjach. Pozwalają one uzyskać cieńsze warstwy SiO_2 , jednak regulacja grubości warstwy i powtarzalność jest ściśle uzależniona od bardzo dokładnego kontrolowania wielu parametrów fizykochemicznych, a uzyskiwane grubości warstw przybierają raczej wartości dyskretne niż dają się kontrolować w sposób ciągły [16].

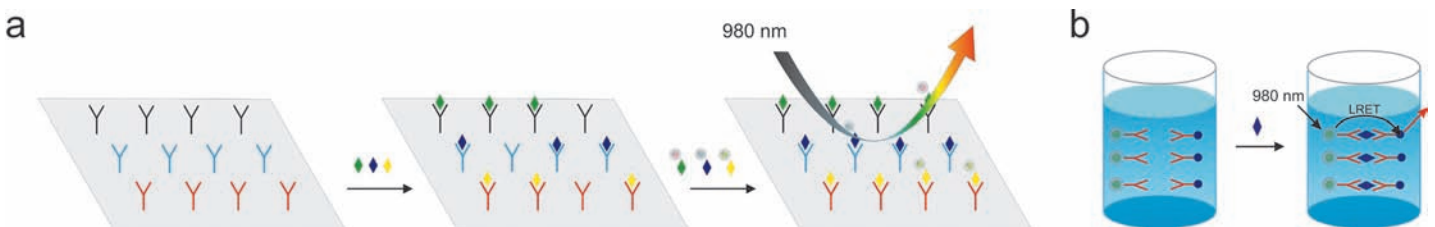
Do wielu zastosowań, w tym m.in. do terapii fotodynamicznej, wymagane jest uzyska-

nie w sposób kontrolowany rozwiniętych i porowatych powierzchni. Dotychczas opisane metody wymagają zastosowania dodatkowych etapów w celu uzyskania porowatości, wśród których często znajduje się kalcynacja [17]. Fotosensybilizacja również stanowi osobny proces, którym może być przyłączenie w sposób kowalencyjny fotosensybilizatora do zmodyfikowanej wcześniej powierzchni lub nasączenie porowatych nanocząstek w odpowiednim roztworze fotosensybilizatora [17]. Tak przygotowane nanocząstki mają jednak tendencję do aglomerowania, a barwnik z ich powierzchni jest stopniowo wymywany.

Większości wskazanych powyżej wad metod Stöbera i mikroemulsyjnej jest pozbawiona nowa metoda pokrywania hydrofobowych nanocząstek warstwą SiO_2 [18]. W pierw-



Rys. 2. Zdjęcia TEM pokazują różną porowatość nanocząstek $\text{NaGdF}_4:\text{Ln}^{3+}$ pokrytych SiO_2 , otrzymanych z roztworu octanu etylu (A) i cykloheksanu (B). Obraz mapowania 2D techniką EDX (C) ukazuje strukturę typu rdzeń-płaszcz otrzymanych nanocząstek (na przykładzie $\text{NaGdF}_4:\text{Eu}^{3+}$)



Rys. 3. Schemat testu z wykorzystaniem nanocząsteczek. Opis w tekście

szym etapie otrzymuje się mikroemulsję hydrofobowych nanocząstek w wodzie z wykorzystaniem odpowiedniego surfaktanta, np. bromku heksadecylotrimetyloamoniowego. W etapie drugim następuje pokrycie nanocząstek warstwą SiO_2 i ich ewentualna fotosensybilizacja. Proces przebiega w układzie dwufazowym: warstwę wodną stanowi mikroemulsja nanocząstek, do której dodaje się roztwór L-argininy pełniącej rolę katalizatora, natomiast drugą fazę ciekłą stanowi roztwór tetraetoksyilanu (i np. ftalocyjaniny cynku) w rozpuszczalniku organicznym (np. octanie etylu lub cykloheksanie). Zdjęcia TEM (rys. 2) potwierdzają, że metodą tą otrzymuje się niezaglomerowane nanocząstki NaGd -

$\text{F}_4:\text{Ln}^{3+}$ pokryte warstwą SiO_2 o różnej grubości i porowatości, w zależności od warunków reakcji.

Zastosowania

Testy immunologiczne z wykorzystaniem NC jako markerów można podzielić na dwa typy: testy hetero- i homogeniczne, a te znowu można podzielić na kompetycyjne (rys. 3a) i niekompetycyjne. W heterogenicznych testach przeciwciała immobilizowane jest na odpowiednim podłożu, które zostaje następnie zmodyfikowane nanocząstkami antygeny lub badanym roztworem, a następnie znakowanym antygenem. W obu przypadkach pomiar emisji dostarcza informacji o stężeniu danego analitu.

Urządzenia pomiarowe



Przetworniki:
wilgotności
punktu rosy
wody w oleju



Termohigrometr
±1.5% firmy Vaisala HM40



Licznik cząstek z poborem próbek
28.3l/min | 50l/min | 100l/min

TEST-THERM Sp. z o.o.

ul. Friedleina 4-6
30-009 Kraków
tel. +48 12 632 1301, +48 12 632 6188
fax +48 12 632 1037
<http://www.test-therm.pl/>
e-mail: office@test-therm.pl

W przypadku testów homogenicznych (rys. 3b) po związaniu zmodyfikowanego NC przeciwciała ze zmodyfikowanym antygenem (np. za pomocą nanocząstek złota lub barwnika organicznego) w wyniku transferu energii obserwuje się zmianę emisji, na podstawie której można określić stężenie badanego analitu. Tego typu testy pozwalają stwierdzić np. formowanie podwójnych nici DNA. W literaturze coraz częściej spotyka się przykłady zastosowania QDs i innych nanocząstek do barwienia komórkowego i pierwszych testów *in vivo*, co wskazuje na znaczny postęp w tej dziedzinie w ciągu ostatniej dekady. Nietrudno przy tym zauważyć jak wielką zaletą jest zastosowanie nanocząstek zamiast znaczników organicznych. Przykładowo Yu i wsp. [19] wykazali, że już po 400 sekundach nie można zarejestrować emisji barwników organicznych (DAPI, Dil) natomiast emisja $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ nie ulega zmianie. Pozwala to zaliczyć nanocząstki do najbardziej perspektywicznych materiałów jeśli chodzi o ich zastosowanie jako znaczniki luminescencyjne, sensory chemiczne, a także w testach immunoenzymatycznych czy w obrazowaniu komórkowym. Oprócz zastosowań diagnostycznych szczególnie interesująco przedstawiają się możliwości terapeutycznego wykorzystania UCNPs obejmujące m.in. dostarczanie leków

oraz terapię termo- czy fotodynamiczną. Dodatkowa zaleta wynika z możliwości konstruowania w oparciu o UCNPs nanoplateform o funkcjonalności pozwalającej nie tylko na terapię, ale również na jednoczesną diagnostykę oraz bieżące monitorowanie efektów leczenia, a więc realizację idei określonej pojęciem *teranostyka*.

Podsumowanie

Przedstawione powyżej przykłady demonstrują przewagę nanocząstek jako znaczników biologicznych nad fluoroforami organicznymi, należy jednak mieć na uwadze, że ta dziedzina nauki wymaga jeszcze znacznego rozwoju przed zastosowaniem w testach *in vivo*. Wykorzystywana obecnie aparatura diagnostyczna również nie jest przystosowana do rejestrowania sygnałów pochodzących z NC, niemniej jednak ciągły rozwój w dziedzinie optoelektroniki przy jednoczesnym obniżeniu kosztów produkcji diod laserowych i detektorów pozwala mieć duże nadzieje na szybkie upowszechnienie nowych typów aparatury. Na podstawie literatury można stwierdzić, że największy potencjał do zastosowania komercyjnego przedstawiają nanocząstki domieszkowane jonami lantanowców. Długie czasy zaniku, wąskie pasma emisji i możliwość wykorzystania transferu energii w połączeniu z niską toksycznością stawiają je na pierwszym miejscu wśród nowoczesnych

znaczników biologicznych. Mimo, że wyniki dotychczasowych badań są bardzo obiecujące, pełne wykorzystanie potencjału NC w teranostyce wymaga rozwiązania szeregu problemów, a jednym z głównych wyzwań jest otrzymanie wielofunkcyjnych nanoplateform o rozmiarze hydrodynamicznym nie większym niż 10 nm. Ta graniczna wielkość wynika z faktu, że nanocząstki nie są biodegradowalne i muszą być wydalone z organizmu. Konieczne są również dalsze wysiłki w celu opracowania skutecznych metod modyfikacji powierzchni, które pozwalałyby otrzymać nanocząstki wykazujące długoterminową stabilność koloidalną w wodzie, buforach i mediach zawierających surowicę przy jednoczesnym zachowaniu wydajnej fotoluminescencji. Intensywne prace nad tymi zagadnieniami prowadzone są obecnie w wielu ośrodkach badawczych na całym świecie.

Bibliografia

- [1] T. Jamieson, R. Bakhshi, D. Petrova, R. Pocock, M. Imani, A. M. Seifalian, *Biomaterials*, 28 (2007) 4717.
- [2] M. Mycek, B. Pogue, *Handbook of Biomedical Fluorescence*, CRC Press, 2003.
- [3] W. Feng, K.C. Dev, L. Zhengquan, Z. Yong, F. Xianping, W. Minquan, *Nanotechnology*, 17 (2006) 5786.
- [4] M. Y. Han, X. H. Gao, J. Z. Su, S. Nie, *Nat. Biotechnol.*, 19 (2001) 631.

- [5] W. Chan, S. Nie, *Science*, 281 (1998) 2016.
- [6] S. Santra, K. M. Wang, R. Taped, W. H. Tan, *J. Biomed. Opt.*, 6 (2001) 160.
- [7] R. M. Raab, G. Stephanopoulos, *Biotechnol. Bioeng.*, 88 (2004) 121.
- [8] L. Manna, E. Scher, L. Li, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 7136.
- [9] M. A. Hines, P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.*, 100 (1996) 468.
- [10] H. Tetsuo Uyeda, I. L. Medintz, J. K. Jaiswal, S. M. Simon, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 3870.
- [11] M. De, P. S. Ghosh, V. M. Rotello, *Adv. Mater.*, 20 (2008) 4225.
- [12] R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.*, 19 (2001) 316.
- [13] J. L. Boulnois, *Lasers Med. Sci.*, 1 (1986) 47.
- [14] G. Mie, *Ann. Phys.*, 330 (1908) 377.
- [15] W. Stöber, A. Fink, E. J. Bohn, *Colloid Interface Sci.* 26 (1968) 62.
- [16] Y. Jin, S. Lohstreter, D. T. Pierce, J. Parisien, M. Wu, C. Hall, J. X. Zhao, *Chem. Mater.*, 20 (2008) 4411.
- [17] H. Qian, H. C. Guo, P. C. L. Ho, R. Mahendran, Y. Zhang, *Small*, 5 (2009) 2285.
- [18] J. Cichos, M. Karbowski, *J. Mater. Chem. B*, 2 (2014) 556.
- [19] M. X. Yu, F. Y. Li, Z. G. Chen, H. Hu, C. Zhan, H. Yang, C. H. Huang, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 930.

* *Jakub Cichos, Mirosław Karbowski – Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii*