

Оптические метки на основе золотых нанозвёзд для ГКР-картирования тканей с использованием красных медицинских лазеров

© В.О. Свинко, А.И. Шевчук, А.Н. Смирнов, Д.В. Макеева, Е.В. Соловьева

Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,
198504 Санкт-Петербург, Россия

e-mail: e.solovieva@spbu.ru

Поступила в редакцию 03.08.2022 г.

В окончательной редакции 03.08.2022 г.

Принята к публикации 11.08.2022 г.

Исследованы золотые наночастицы звездообразной формы, модифицированные производными цианина 5.5, в качестве оптических меток для биовизуализации методом гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). Спектры поглощения показали, что полученные метки имеют полосу плазмонного резонанса на длине волны 640 nm, что обеспечивает их максимальную эффективность при возбуждении красными лазерами. Спектральные измерения проведены для модифицированных частиц в фазе раствора и после инкубации с клеточной линией PANC-1. Спектры ГКР растворов показали, что характеристичный сигнал аминопроизводного цианина 5.5 наблюдается в диапазоне $100\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$, где нет высокого флуоресцентного фона. В клеточных образцах спектр ГКР красителя зафиксирован в цитоплазме и не обнаружен вне клеток. С целью подтверждения внутриклеточной локализации меток также выполнено сканирование ГКР-сигнала по высоте. Тест на цитотоксичность показал, что исследуемые метки не оказывают токсичного действия в диапазоне концентраций от 0.05 до 1 mg/l по атомарному золоту.

Ключевые слова: гигантское комбинационное рассеяние, золотые нанозвёзды, цианин, оптические метки, биовизуализация.

DOI: 10.21883/OS.2022.10.53631.3709-22

Введение

Лазеры с длиной волны в диапазоне 630–660 nm широко используются в различных областях медицины: в молекулярной томографии, дерматологии, хирургии и офтальмологии. Преимущества красных лазеров заключаются в их достаточно высокой эффективности и безопасности [1]. Красный луч способен проникать в ткани человека на глубину от 0.1 до 5 mm, поэтому такие лазеры могут использоваться для диагностики и терапии различных поверхностных новообразований. Разработка селективно направленных оптических меток, возбуждаемых красными лазерами, представляет высокий интерес для лечения определенных типов раковых опухолей [2]. В частности, подобные оптические агенты уже предложены для лечения меланомы [3] и выявления рака молочной железы [4].

Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) света является одним из наиболее активно развивающихся методов биовизуализации. В данном методе в качестве меток нередко используются функционализированные плазмонные наночастицы (НЧ) или системы по типу „ядро–оболочка“. Спектроскопия ГКР может быть реализована для целей биовизуализации в режимах *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*, а ее более высокая селективность и чувствительность являются основными преимуществами перед флуоресцентной мик-

роскопией [5,6]. В последнее время появляются достаточно интересные исследования, посвященные разработке КР-томографии [7], которые открывают еще более широкие перспективы практического применения метода ГКР. Однако уже существующие работы по ГКР-картированию биологических образцов демонстрируют возможность получения достаточно точных объемных изображений неровных объектов на глубине до 100 nm [8,9].

Потенциал золотых наночастиц как меток для биовизуализации и агентов для фототермии неоднократно демонстрировался во многих работах [10]. Однако морфология используемых частиц должна выбираться исходя из планируемых практических приложений конкретных меток. Золотые нанозвёзды (ЗНЗ) имеют полосу поглощения в области 620–650 nm [11]. Золотые нанозвёзды не обладают высокой анизотропией в отличие от хорошо известных наностержней [12], которые имеют основную полосу поглощения при более высоких длинах волн, но при этом существенно отличаются от сферических НЧ, которые поглощают в области до 600 nm [13]. Стоит отметить, что размер и форма НЧ влияют не только на их оптические свойства, но и на возможность этих частиц быть поглощенными живыми клетками и оказывать влияние на их жизнеспособность. Данную особенность также следует учитывать при разработке плазмонных меток на основе НЧ различной морфологии [14–16].

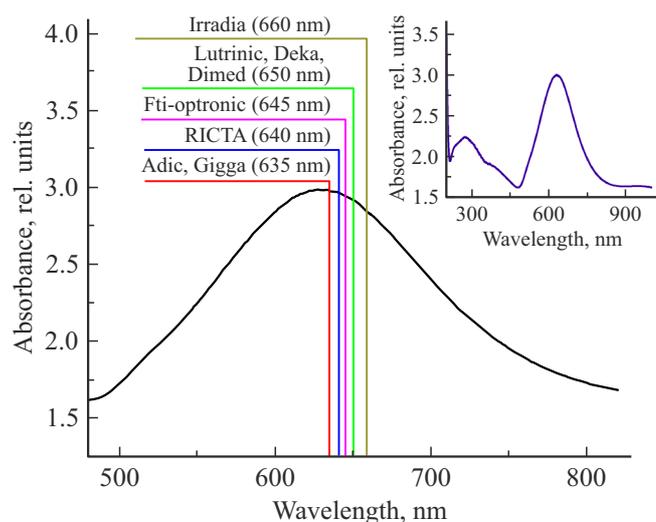


Рис. 1. Спектр поглощения ЗНЗ. Вертикальные линии указывают длины волн некоторых практически используемых медицинских красных лазеров.

В отношении ЗНЗ имеются литературные сведения о том, что они способны проникать в клетки с высокой эффективностью [17,18]. Таким образом, ЗНЗ являются подходящими объектами для биовизуализации с использованием красных лазеров и по этим причинам выбраны в качестве основы оптических меток, исследуемых в настоящей работе.

Существуют два типа синтеза ЗНЗ: двухстадийные методы наращивания зерен [19] и одностадийные методы без использования зародышей [20]. Длина луча ЗНЗ сильно зависит от соотношения используемых реагентов [18], в частности, более высокое соотношение Au^{3+} /аскорбиновая кислота обеспечивает большую длину лучей нанозвезды. Кроме того, важно учитывать стабильность частиц, которая зависит от способа получения и типа стабилизирующего агента [21], поскольку для биовизуализации можно использовать только системы, обладающие длительной агрегативной устойчивостью. Настоящая работа направлена на получение, исследование и биологическое тестирование стабильных оптических меток по типу „ядро–оболочка“ на основе ЗНЗ, обладающих наиболее эффективным откликом ГКР при возбуждении лазером с длиной волны от 630 до 660 nm.

Методика эксперимента

Золотые нанозвезды получены путем одностадийного синтеза по методу Хе и соавторов [22]. Дальнейшая модификация ЗНЗ включала стадии функционализации красителем, покрытия биосовместимой оболочкой и присоединения вектора доставки к рецептору фолиевой кислоты. Покрытие ЗНЗ полимерной оболочкой выполнено по методике „слой за слоем“ с использованием полимера в анионной форме полистиролсульфоната (ПСС) и

полимера в катионной форме полидиаллилдиметиламмонийхлорида (ПДДА). Производные красителя цианина 5.5 (Су-5.5) выбраны в качестве КР-меток по следующим причинам. Диапазон их оптического поглощения соответствует области поглощения ЗНЗ, вследствие чего обеспечивается более высокая вероятность наблюдения резонансного комбинационного рассеяния. Краситель вводили в полимерную оболочку путем добавления в раствор перед нанесением запечатывающего слоя полимера. Для этого раствор красителя с концентрацией $1.2 \cdot 10^{-4}$ М добавляли по каплям к коллоидному раствору ЗНЗ при перемешивании в соотношении 1 : 20. Имобилизация красителя на поверхности НЧ протекала за счет адсорбционных взаимодействий. Избыток не адсорбированного красителя удаляли центрифугированием. Фолиевую кислоту использовали в качестве модельного вектора доставки, нанося её на внешний полимерный слой покрываемых ЗНЗ.

Спектрофотометрический анализ исходного раствора ЗНЗ и модифицированных систем на их основе выполнен на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu). Спектр регистрировался в диапазоне от 200 до 1100 nm с шагом 1 nm. Для съемки использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 cm. Базовая линия снималась по деионизированной воде при тех же условиях.

Изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) ЗНЗ получены на электронном микроскопе Libra 200FE (Carl Zeiss) с ускоряющим напряжением 200 kV. ПЭМ-изображения в сканирующем режиме зарегистрированы от трех случайных областей образца. Раствор ЗНЗ капельно наносился (10 mkl) на поверхность углеродных пленок, после чего образцы были помещены в темное место для испарения растворителя на воздухе.

Спектры ГКР зарегистрированы на спектрометре LabRam-HR 800 (Horiba Jobin-Yvon). Для возбуждения спектров использована линия с длиной волны 632.8 nm He–Ne-лазера. Мощность лазерного излучения составляла 20 mW при измерениях в растворе и 2 mW при съемке клеточных образцов.

Тест на цитотоксичность проводили с использованием тетразолиевого красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид. Клеточную линию PANC-1 засевали в 96-луночный планшет с популяцией 10000 клеток на лунку и инкубировали в течение 24 h. Растворы модифицированных ЗНЗ, приготовленные в питательной среде DMEM с концентрацией по атомарному золоту от 0.05 до 1 mg/l, добавляли к клеткам и инкубировали в течение 24 h. После этого добавляли тетразолиевый краситель с концентрацией 0.15 mg/ml и инкубировали в течение 1 h. Затем в каждую лунку добавляли по 100 μ m диметилсульфоксида и измеряли поглощение при длине волны 570 nm.

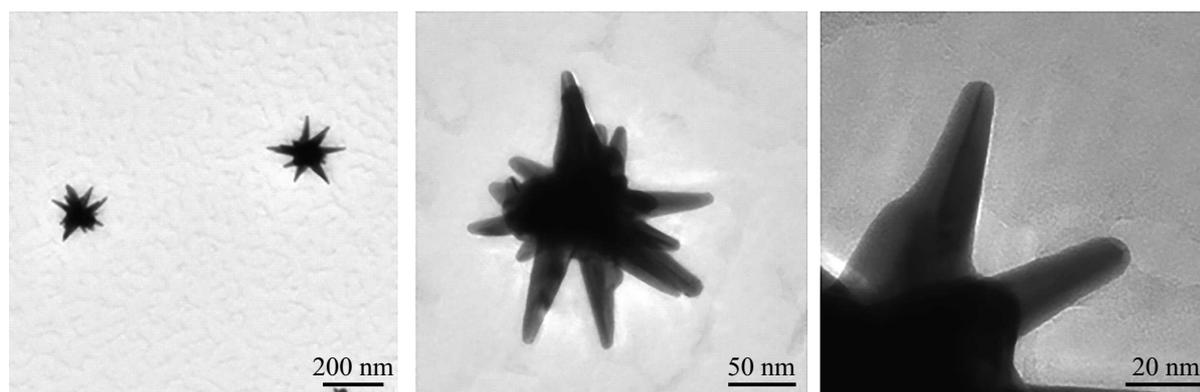


Рис. 2. ПЭМ-изображения исследуемых ЗНЗ.

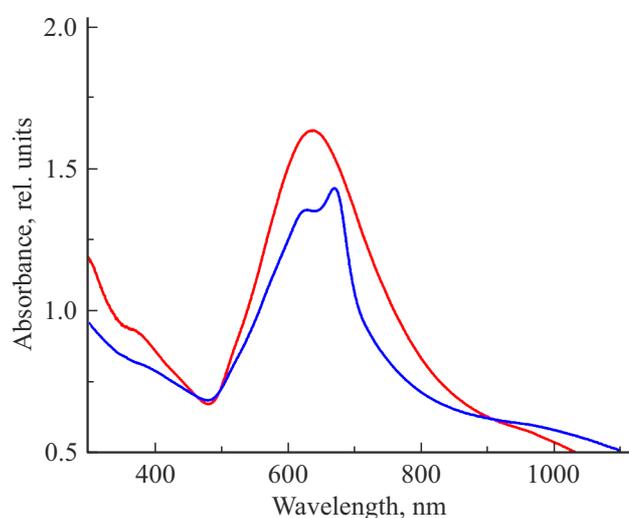


Рис. 3. Спектры поглощения ЗНЗ после добавления красителя (синяя кривая) и после финального присоединения фолиевой кислоты (красная кривая). Спектры нормированы по интенсивности на длине волны 485 nm.

Результаты и их обсуждение

Спектры поглощения исследуемых ЗНЗ представлены на рис. 1. Как видно, полоса поглощения перекрывает диапазон практически от 500 до 800 nm, при этом максимум приходится на длину волны 620 nm. Для наглядности на рис. 1 также нанесены вертикальные линии, указывающие длины волн некоторых практически используемых медицинских красных лазеров. Как видно, их длины волн попадают в правое плечо полосы поглощения ЗНЗ, но при этом не сильно удалены от максимума. Данное взаимное расположение максимума поглощения металлического субстрата и длины волны источника возбуждения считается оптимальным в спектроскопии ГКР и позволяет рассчитывать на возникновение интенсивного сигнала. Использование для наблюдения ГКР лазеров с длиной волны несколько большей, чем максимум поглощения металлического субстрата,

считается более выгодным в сравнении с ситуацией их абсолютного совпадения, так как обеспечивает условия наиболее эффективного усиления как возбуждающего, так и рассеянного излучения, участвующего в процессе комбинационного рассеяния [23].

ПЭМ-изображения полученных ЗНЗ представлены на рис. 2. Каждая частица состоит из ядра диаметром около 60 nm и 7–10 коротких и длинных лучей, направленных в разные стороны. Наблюдаемая морфология хорошо коррелирует с зарегистрированными спектрами поглощения. Отсутствие выраженного разделения на поперечную и продольную моды локализованного плазмонного резонанса определяется относительно симметричными продольными размерами в отношении ширины и длины частиц. Наличие лучей с длиной от 20 до 70 nm приводит к значительному смещению поглощения в длинноволновую область в сравнении со сферическими золотыми наночастицами.

Покрытие металлического ядра оболочкой зачастую применяется для функционализации наночастиц и обеспечения их агрегативной устойчивости в средах сложного состава, в том числе с высоким солевым фоном. Подобная методика также применена в настоящей работе в отношении ЗНЗ. Для контроля функционализации красителем и отслеживания агрегативной устойчивости регистрировались спектры поглощения после отдельных стадий модификации ЗНЗ. Спектры, полученные после добавления красителя и после финальной стадии присоединения фолиевой кислоты, представлены на рис. 3. Ярко выраженный пик при 671 nm в спектре после добавления красителя свидетельствует об успешном его вхождении в оболочку частиц. Однако необходимо отметить частичное вымывание красителя после последующей стадии присоединения фолиевой кислоты, остаточное содержание красителя после всех стадий покрытия составило порядка 40–60% от исходной концентрации в растворе ЗНЗ. В целом спектры поглощения демонстрируют высокую агрегативную устойчивость полученных систем, так как максимум полосы поглощения модифицированных ЗНЗ в точности соответствует максимуму

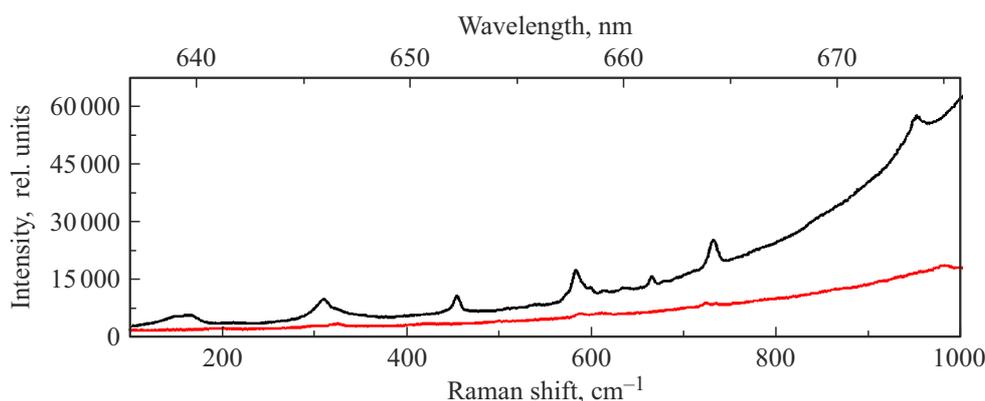


Рис. 4. Спектры ГКР Су-5.5 амина (черная кривая) и сульфо Су-5.5 активированного эфира (красная кривая), адсорбированных на ЗНЗ.

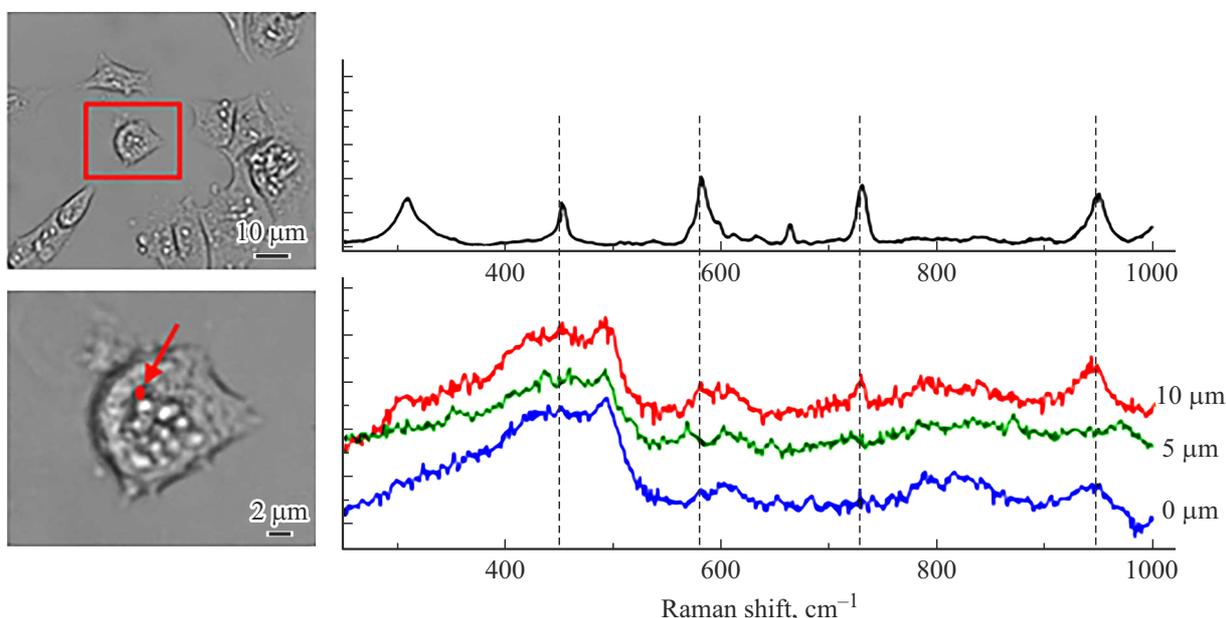


Рис. 5. Оптические изображения клеточного образца, для которого проведена съемка спектров ГКР (слева); спектры ГКР аминокпроизводного Су-5.5 в растворе ЗНЗ после вычета базовой линии (справа сверху); спектры ГКР модифицированных ЗНЗ, зарегистрированные в клетках PANC-1 на различной глубине относительно их поверхности (справа снизу). Красная точка на оптическом изображении указывает область регистрации спектров ГКР внутри клетки.

полосы поглощения исходного коллоидного раствора, что говорит об отсутствии агломератов.

Правильный выбор молекул, которые будут выступать источником сигнала оптической метки, является важным этапом при их разработке. В случае использования красителей в качестве КР-меток нередко возникает проблема высокого фонового сигнала флуоресценции, который может перекрывать целевой КР-сигнал. Проведение предварительных спектральных измерений в фазе раствора зачастую помогает спрогнозировать оптический отклик. Именно с этой целью зарегистрированы спектры ГКР двух производных Су-5.5 в исходном растворе ЗНЗ, которые представлены на рис. 4.

Как видно, флуоресцентный фон присутствует как для аминокпроизводного Су-5.5 (черная кривая), так и для сульфо активированного эфира (красная кривая). Однако в спектре производного с аминогруппой в низкочастотной области проявляются значимые характерные КР-полосы от красителя. Наблюдаемое различие между двумя производными Су-5.5 можно связать с различным положением полосы эмиссии данных соединений и более высокой аффинностью к поверхности аминокпроизводного. Диапазон эмиссии сульфоактивированного эфира Су-5.5 приходится на область 650–800 nm с максимумом при 700 nm, в то время как диапазон эмиссии аминокпроизводного Су-5.5 приходится на область 660–850 nm с максимумом при 710 nm. Казалось бы,

несущественное различие в положении полос эмиссии является определяющим для получения сигнала ГКР при возбуждении гелий-неоновым лазером с длиной волны 632.8 nm. Особенно наглядно это прослеживается в спектрах ГКР, соотношенных с абсолютной шкалой длин волн, выраженной в нанометрах (верхняя шкала на рис. 4). Смещение на 10 nm в длинноволновую область полосы эмиссии аминокислотного Су-5.5 обеспечивает „окно“ в диапазоне волновых чисел 0-800 cm^{-1} , в котором флуоресцентный фон достаточно низкий. Таким образом, любая из компонент в области 100–800 cm^{-1} в спектре ГКР аминокислотного Су-5.5 может быть использована для картирования, проводимого с метками на основе ЗНЗ. Данные полосы использовали для отслеживания модифицированных ЗНЗ в последующих экспериментах с клетками.

Спектры ГКР, полученные от клеточных образцов после инкубации с модифицированными ЗНЗ, приведены на рис. 5. Слабый, но характеристичный сигнал в области 100–1000 cm^{-1} обнаружен для всех клеток (рис. 5). Спектры ГКР, записанные со сканированием по высоте, измерены для проверки внутриклеточного расположения ЗНЗ. Наблюдаемое увеличение интенсивности сигнала аминокислотного Су-5.5 по мере сдвига фокуса с поверхности в объем клетки свидетельствует о том, что частицы находятся внутри неё, а не на поверхности. Наблюдаемый более слабый сигнал в сравнении со спектрами ЗНЗ в растворе связан как с более низкой мощностью используемого лазерного излучения, так и с меньшим содержанием частиц в клетке.

Цитотоксичность любых оптических меток, используемых для биовизуализации, должна быть проверена до их испытаний на животных и последующего применения. Поэтому с системами на основе ЗНЗ был проведен МТТ-тест на фолат-рецептор положительной клеточной линии PANC-1 (рис. 6). Как видно из рисунка, жизнеспособность клеток в присутствии ЗНЗ соответствует в

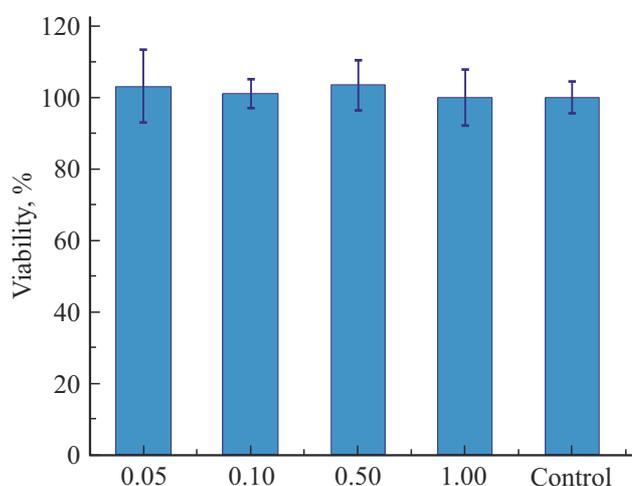


Рис. 6. Жизнеспособность клеточной линии PANC-1 после инкубации с модифицированными ЗНЗ в течение 24 h. На оси абсцисс указаны концентрации по атомарному золоту.

пределах погрешности жизнеспособности контрольных образцов. На основании этого можно говорить о том, что исследуемые ЗНЗ с фолиевой кислотой в качестве вектора доставки не проявляют токсичных свойств в диапазоне концентраций по атомарному золоту от 0.05 до 1 mg/l. Полученный результат открывает перспективу дальнейшего тестирования систем на основе ЗНЗ на животных и возможного перехода к доклиническим испытаниям.

Выводы

В работе получены оптические метки для биовизуализации методом ГКР на основе ЗНЗ и цианиновых красителей, возбуждаемые в красном диапазоне электромагнитного спектра. Плазмонное ядро метки обеспечивает выраженный сигнал ГКР от красителя, расположенного в полимерной оболочке. При возбуждении гелий-неоновым лазером рабочий спектральный диапазон метки, не перекрываемый флуоресценцией, составляет 100–1000 cm^{-1} , в котором пять колебательных полос Су-5.5 могут быть использованы в качестве характеристичного сигнала для картирования клеток. Спектры ГКР, зарегистрированные после инкубации частиц с клеточной линией PANC-1, подтверждают внутриклеточную локализацию меток. Тест на цитотоксичность показал, что метки на основе ЗНЗ не оказывают токсичного действия в диапазоне концентраций от 0.05 до 1 mg/l по атомарному золоту. В целом, результаты работы демонстрируют высокий потенциал применения оптических меток на основе ЗНЗ для диагностических целей с использованием красных медицинских лазеров.

Благодарности

Авторы благодарят Ресурсные центры СПбГУ: „Оптические и лазерные методы исследования вещества“, „Методы анализа состава вещества“, „Междисциплинарный центр нанотехнологий“ и „Центр молекулярных и клеточных технологий“.

Финансирование работы

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Санкт-Петербургского государственного университета, проект № 92350587 (синтез и модификация золотых наночастиц, ПЭМ и ГКР-измерения) и при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 22-73-10052, <https://rscf.ru/project/22-73-10052/> (МТТ-тестирование с клеточными линиями).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- [1] R. Steiner. *Laser-Tissue Interactions, Laser and IPL Technology in Dermatology and Aesthetic Medicine*, 23–36 (2011). DOI: 10.1007/978-3-642-03438-1_2
- [2] Q. Peng, A. Juzeniene, J. Chen, L.O. Svaasand, T. Warloe, K.E. Giercksky, J. Moan. *Rep. Progr. Phys.*, **71**(5), 056701 (2008). DOI: 10.1088/0034-4885/71/5/056701
- [3] M.K. Yeh, C.C. Chen, D.S. Hsieh, K.J. Huang, Y.L. Chan, P.D. Hong, C.J. Wu. *Development and Therapy*, 459 (2014). DOI: 10.2147/DDDT.S58414
- [4] Y. Wu, Y. Feng, X. Li. *J. Colloid and Interface Sci.*, **611**, 287–293 (2022). DOI: 10.1016/j.jcis.2021.12.039
- [5] W. Zhang, L. Jiang, J. A. Piper, Y. Wang. *J. Analysis and Testing*, **2**(1), 26–44 (2018). DOI: 10.1039/c4sc02600d
- [6] А.Н. Спицын, Д.В. Уткин, О.С. Кузнецов, П.С. Ерохин, Н.А. Осина, В.И. Кочубей. *Опт. и спектр.*, **129**(1), 100 (2021). DOI:10.21883/OS.2021.01.50446.200-20
- [7] S. Wagner, T. Dieing, A. Centeno, A. Zurutuza, A.D. Smith, M. Östling, S. Kataria, M.C. Lemme. *Nano Lett.*, **17**(3), 1504–1511 (2017). DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b04546
- [8] T. Böhm, R. Moroni, S. Thiele. *J. Raman Spectr.*, **51**(7), 1160–1171 (2020). DOI: 10.1002/jrs.5878
- [9] X. Luo, D. Chen, Y. Zhan, J. Liang, X. Chen. *Proc. SPIE* **10890**, 1089009 (2019). DOI: 10.1117/12.2508455
- [10] А.Б. Бучарская, Г.Н. Маслякова, М.Л. Чехонацкая, Н.Б. Захарова, Г.С. Терентюк, Н.А. Наволокин, Б.Н. Хлебцов, Н.Г. Хлебцов, В.Д. Генин, А.Н. Башкатов, Э.А. Генина, В.В. Тучин. *Опт. и спектр.*, **128**(6), 846 (2020). DOI:10.21883/OS.2020.06.49419.34-20
- [11] M. Chirumamilla, A. Gopalakrishnan, A. Toma, R. Proietti Zaccaria, R. Krahn. *Nanotechnology*, **25**(23), 235303 (2014). DOI: 10.1088/0957-4484/25/23/235303
- [12] A. Yoshida, N. Uchida, N. Kometani. *Langmuir*, **25**(19), 11802–11807 (2009). DOI: 10.1021/la901431r
- [13] J.A. Jenkins, T.J. Wax, J.Zhao. *J. Chem. Education*, **94**(8), 1090–1093 (2017). DOI: 10.1021/acs.jchemed.6b00941
- [14] B.D. Chithrani, A.A. Ghazani, W.C. Chan. *Nano Lett.*, **6**(4), 662–668 (2006). DOI: 10.1021/nl052396o
- [15] I. Canton, G. Battaglia. *Chem. Soc. Rev.*, **41**(7), 2718 (2012). DOI: 10.1039/c2cs15309b
- [16] N.M. Schaeublin, L.K. Braydich-Stolle, E.I. Maurer, K. Park, R.I. McCuspie, A.R. Afrooz, R.A. Vaia, N.B. Saleh, S.M. Hussain. *Langmuir*, **28**(6), 3248–3258 (2012). DOI: 10.1021/la204081m
- [17] Q. Wei, H.M. Song, A.P. Leonov, J. A. Hale, D. Oh, Q.K. Ong, K. Ritchie, A. Wei. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**(28), 9728–9734 (2009). DOI: 10.1021/ja901562j
- [18] A. Guerrero-Martínez, S. Barbosa, I. Pastoriza-Santos, L.M. Liz-Marzán. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **16**(2), 118–127 (2011). DOI: 10.1016/j.cocis.2010.12.007
- [19] S. He, M.W. Kang, F.J. Khan, E.K. Tan, M.A. Reyes, J.C. Kah. *J. Optics*, **17**(11), 114013 (2015). DOI: 10.1088/2040-8978/17/11/114013
- [20] M.S. Verma, P.Z. Chen, L. Jones, F.X. Gu. *RSC Adv.*, **4**(21), 10660–10668 (2014). DOI: 10.1039/C3RA46194G
- [21] Y. Xia, X. Xia, H.C. Peng. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**(25), 7947–7966 (2015). DOI: 10.1021/jacs.5b04641
- [22] S. He, M.W. Kang, F.J. Khan, E.K. Tan, M.A. Reyes, J.C. Kah. *J. Optics*, **17**(11), 114013 (2015). DOI: 10.1088/2040-8978/17/11/114013
- [23] B. Sharma, R.R. Frontiera, A.I. Henry, E. Ringe, R.P. Van Duyne. *Mater. Today*, **15**(1–2), 16–25 (2012).