

# **Софийски Университет „Св. Кл. Охридски”**

Медицински факултет  
Катедра „Физика, биофизика и рентгенология”  
ул. „Козяк” 1, гр. София 1407, България

---

**РУМЯНА АТАНАСОВА БАКАЛОВА-ЖЕЛЕВА**

## **ТЕМА**

**Разработване на мултифункционални бионанопроби на основата на квантови точки: структура, физикохимични характеристики и приложение за флуоресцентни имиджинг анализи и фотосенсибилизация**

## **А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

### **НА ДИСЕРТАЦИЯ**

за присъждане на научната степен  
**„доктор на науките”**

Научно направление 4.3. Биологически науки  
Научна специалност „Биофизика” (шифър 01.06.08)

### **Научно жури:**

Чл.кор., проф. Андон Радев Косев, дбн – рецензент  
Проф. Албена Момчилова, дбн – рецензент  
Доц. Божидар Галуцов, дб – рецензент  
Проф. Върбан Стоянов Ганев, дбн  
Проф. Стефан Рачев Робаров, дбн  
Проф. Яна Христова Цонева, дбн  
Доц. Геновева Антонова Златева, дф

София  
2011

Експерименталните изследвания по настоящия дисертационен труд са проведени в Националния Институт за Авангардни Технологии на Япония (AIST-Japan), Националния Институт за Радиологични Изследвания на Япония (NIRS-Japan), Тракийския Университет (Стара Загора, България) и Софийския Университет „Св. Кл. Охридски“ (София, България).

Бих искала да изкажа огромната си благодарност към всички колеги за съдействието и помощта при разработването и подготовката на настоящия дисертационен труд: д-р Живко Желев, д-р Ичио Аоки, д-р Хидеки Оба, проф. д-р Ивао Канно, проф. д-р Веселина Гаджева.

## **Списък на използваните съкращения**

- ALL – Acute Lymphoblastic Leukemia (акутна лимфобластомна левкемия)
- BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
- BRET – Bioluminescence Resonance Energy Transfer (биолуминисцентен резонансен енергиен пренос)
- CD-antibody – Cluster-of-differentiation antibody
- CT – Computing tomography (компютърна томография)
- CTP – Cytidine 5'-triphosphate
- Cy5 – Cyanine-5
- DMSO – Dimethyl sulfoxide
- DOTA – 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid
- DTPA – Diethylene triamine pentaacetic acid
- EDAC – 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydrochloride
- EDC – 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimide
- EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid
- EPR – Electron Paramagnetic Resonance (електронен парамагнитен резонанс)
- FITC – Fluorescein isothiocyanate
- FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer (флуоресцентен резонансен енергетичен пренос)
- HOMO – Highest Occupied Molecular Orbital [най-високата заета от електрона (свързваща) молекулна орбитала]
- IgG – Immunoglobulin G
- LUMO – Lowest Unoccupied Molecular Orbital [най-ниската заета от електрона (антисвързваща) молекулна орбитала]
- MBP – Maltose-Binding Protein (малтозо-свързващ протеин)
- MDA – Malondialdehyde (МДА – малонов диалдехид)
- MMLV – Moloney Murine Leukemia Virus
- MRI – Magnetic Resonance Imaging (ядрено-магнитна резонансна томография)
- FOV – Field of View (зрително поле)
  - IT – Inversion Time (инверсионно време)
  - MS – Matrix Size (големина на матрикса)
  - NA – Number of Averages
  - SE – Spin-Echo (спин-ехо)
  - ST – Slice Thickness (дебелина на срезите)
  - TE – Echo Time
  - TR – pulse Repetition Time (време на повтаряемост на пулса)
- MWCO – Molecular Weight Cut Of
- NIR – Near-Infrared (близката инфрачервена област)
- QD – Quantum Dot (квантова точка, квантов дот)
- QSY9<sup>TM</sup> – гасител на флуоресценция (търговски продукт на Invitrogen)

PAMAM дендример – Poly(amido amine) dendrimer  
PBS – Phosphate-Buffered Saline (буфериран физиологичен разтвор)  
PCR – Polymerase Chain Reaction (верижна полимеразна реакция)  
PE – Phycoerythrin  
PEG – Polyethylene glycol  
PES – Polyethersulfon  
PET – Positron Emission Tomography (позитрон-емисионна томография)  
PI – Propidium iodide  
PSMA – Prostate Specific Membrane Antigen (специфичен за простатата мембранен антиген)  
RGD – Arginine-Glycine-Asparagin peptide (пептид, изграден от 3 аминокиселини – Arg-Gly-Asp)  
RISC – RNA-Induced Silencing Complex (РНК индуциран сайлансинг комплекс)  
RNAi – RNA interference (РНК интерференция)  
mRNA – матрична РНК  
siRNA – Small interfering RNA (интерферираща РНК с малки размери)  
SALPC – Sulphonated aluminium phthalocyanine  
SBA – Soybean Agglutinin (лектин – Соев аглутинин)  
TBA – Thiobarbituric acid (ТБК – тиобарбитурова киселина)  
TBARS – TBA reactive substances (ТБК–активни продукти)  
TBP – Tributylphosphine  
TEM – Transmission Electron Microscopy (трансмисионна електронна микроскопия)  
TET – Triplet Energy Transfer (триплетен енергетичен пренос)  
TFPZ – Trifluoperazine  
TMRE – Tetramethylrhodamine ethyl ester  
TOP – Trioctylphosphine  
TOPO – Trioctylphosphine oxide  
UV – Ultraviolet (ултравиолетова светлина)  
WGA – Wheat Germ Agglutinin (лектин – аглутинин на пшеничния зародиш)

## **Въведение**

### **Проблеми на флуоресцентните методи за биомедицинска диагностика и решаването им с помощта на флуоресцентни нанокристали (квантови точки)**

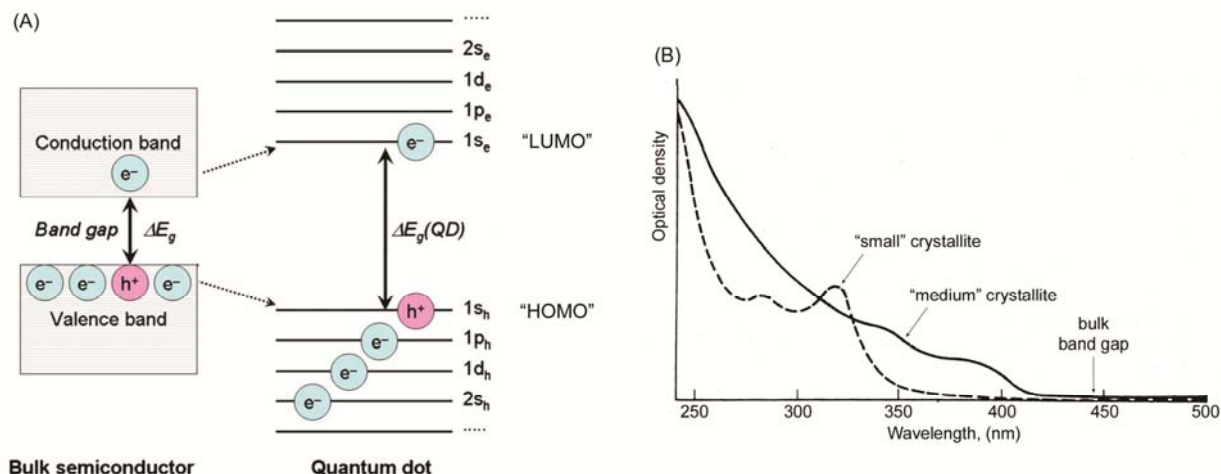
Повече от 80 години флуоресцентните аналитични методи се прилагат успешно за *in vitro* и *in situ* изследвания в предклиничната и експерименталната диагностика – за визуализиране на биомакромолекули (ДНК, РНК, белтъци), фиксирани клетки, клетъчни органели, тъкани, кръвоносни съдове. Флуоресцентният анализ е една от най-чувствителните техники за визуализиране, известни понастоящем – съизмерима с чувствителността на радиологичните диагностични методи, но отличаваща се със значително по-малък риск за здравето на хората и състоянието на околната среда. Високата резолюция на съществуващите понастоящем апаратури за флуоресцентен анализ позволява визуализирането *in vitro* и *in situ* на единични клетки, клетъчни фрагменти и дори на отделни (единични) молекули [Michalet et al., 2003; Jaiswal & Simon, 2007; Hinterstainer & Auer, 2008]. Това е гаранция за бъдещето на флуоресцентните методи за биомедицинска диагностика, които имат потенциала да съчетаят висока чувствителност с висока резолюция и възможности за функционална диагностика. Независимо от посочените предимства обаче, флуоресцентните методи за анализ намират все още твърде ограничено приложение *in vivo*. Причините за това са главно две: (i) ниската прозрачност на живите тъкани за видимата светлина; (ii) липсата доскоро на флуоресцентни проби (флуорофори) с висок екстинкционен коефициент и висок квантов добив в дълговълновата част на видимата и инфрачервената област на спектъра (а до голяма степен и на флуоресцентна апаратура, детектираща в тези области на спектъра), където тъканите се характеризират с относителна прозрачност. Едва в последните 5-6 години, благодарение на разработването на високофлуоресцентни вододиспергируеми наночастици [квантови точки – quantum dot (QD)], се заговори за флуоресцентен имиджинг *in vivo*.

До започване на работата по настоящата дисертация (през 2002 г.) използването на флуоресцентни наночастици за образна диагностика *in vivo* беше единствено в сферата на хипотезите и усилията на голяма част от учените по света (в това число и на нашия колектив) бяха насочени към реализирането на тази идея.

Що се отнася до *in vitro* методите за диагностика, то новите нанотехнологични флуорофори се очаква да увеличат в десетки и стотици пъти чувствителността на настоящите флуоресцентни тестове, което е продиктувано от техните уникални фотофизични свойства.

### **Фотофизични характеристики на квантовите точки**

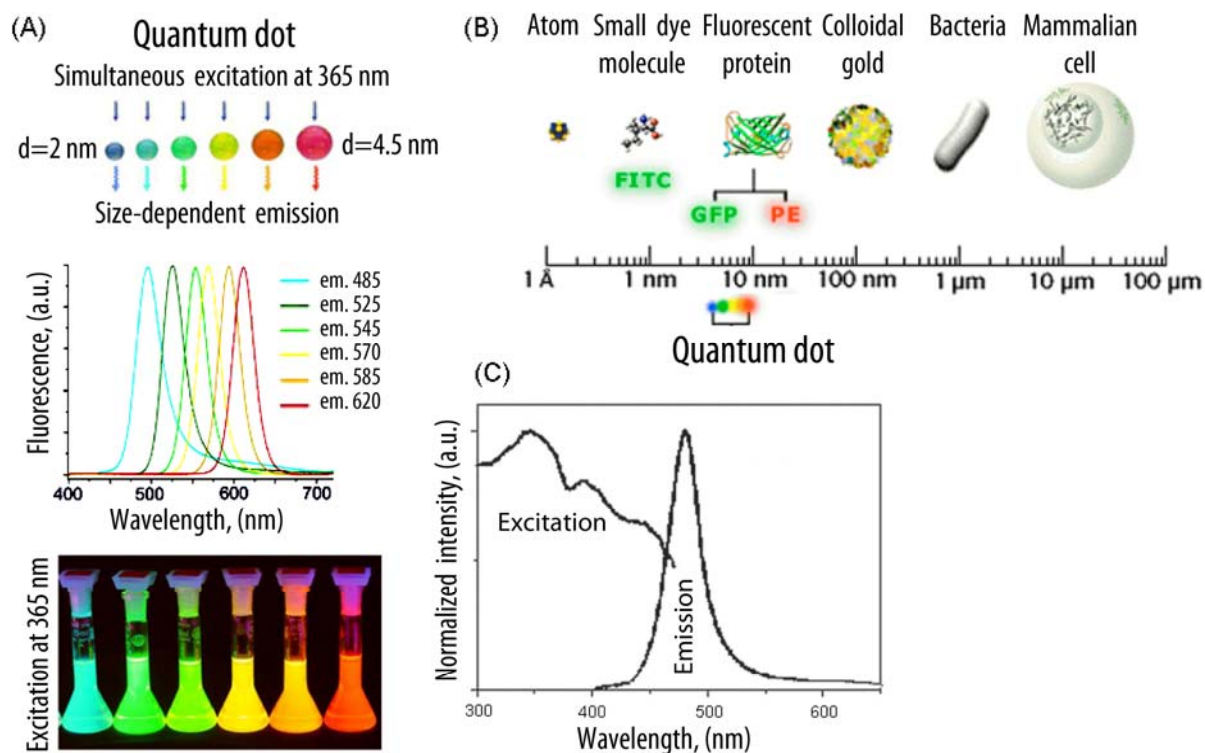
QD представляват неорганични полупроводникови нанокристали (напр. CdSe, ZnS, PbSe, PbS, InP и др.), чиито размери (няколко nm в диаметър) са по-малки от радиуса на Бор за екситона на съответния полупроводников материал [Bruchez & Hotz, 2007; Rogach, 2007]. Това води до т.нар. „ефект на квантово ограничение”, който се състои в това, че във валентната зона и зоната на проводимост на полупроводниковия нанокристал се формират ясноизразени дискретни електронни нива, подобни на HOMO и LUMO нивата в молекулите на органичните флуорофори [Brus, 1986; Bawendi et al., 1990a]. Това, от своя страна, обуславя флуоресцентния потенциал на QD (**Фигура 1**).



**Figure 1.** (A) Simplified diagram, illustrating the energy levels of QD compared to its semiconductor material in a bulk crystal [adapted from Hollingsworth & Klimov (2004) and Juzenas et al. (2008)]. (B) Size-dependent electronic absorption spectra of colloidal ZnSe clusters [according to Brus, 1986 and Nedeljkovic et al., 1986].

Енергетичната разлика между поднивата във валентната и проводимата зона на QD е няколко електронволта (eV). Това обуславя дискретна флуоресцентна емисия във видимата област на спектъра при възбуждане на нанокристалата. Например, при разстояние между нивата 1.7 eV се регистрира емисия в червената област на спектъра, а при 2.4 eV – в зелената [Alivisatos, 1996]. Чрез манипулиране на физическия размер на кристалното ядро могат да се получат наночастици с желани електронни нива и предсказуем, дискретен и тесен спектър на емисия (Фигура 2) [Brus, 1984, 1986; Alivisatos, 1996].

Понастоящем размерите на QD, респ. техните спектрални характеристики, могат да бъдат прецизно контролирани в хода на тяхното нуклеиране и растеж [Peng et al., 1997; Talapin et al., 2001; Qu & Peng, 2002; Donega et al., 2003]. Получават се хомогенни дисперсии от наночастици, флуоресциращи в различни диапазони на спектъра (Фигура 2A). По размер наночастиците са съизмерими с повечето биологични макромолекули (Фигура 2B) [Medintz et al., 2005].



**Figure 2.** (A) Size-dependent emission of CdSe QDs within 495-620 nm at simultaneous excitation at 365 nm. (B) QD size is commensurable with the size of biomacromolecules. (C) Broad excitation spectrum of CdSe QDs [according to [Farias et al., 2008](#)].

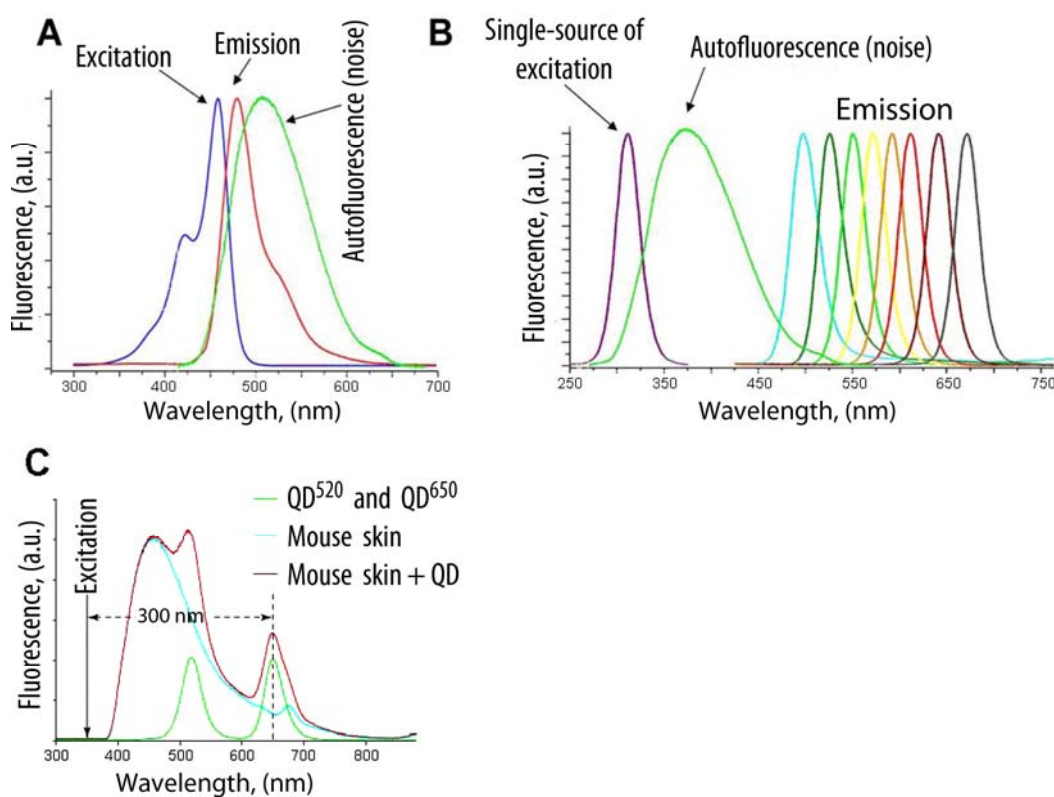
### Предимства на флуоресцентните наночастици (QD) пред конвенционалните органични флуорофори за флуоресцентни анализи на биологични обекти

QD се отличават от органичните флуорофори по следните фотофизични и физикохимични характеристики [[Sapsford et al., 2006a](#); [Resch-Genger et al., 2008](#)]: висок квантов добив (над 50%; повечето органични флуорофори се характеризират с квантов добив ~15-40%); високи моларни екстинкционни коефициенти (от порядъка на  $1 \times 10^5 - 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , които са около 10-100 пъти по-високи от тези на традиционните органични флуорофори –  $5 \times 10^4 - 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ); широк абсорбционен спектър и много тесни, симетрични спектри на флуоресценция (fwhm ~ 25-40 nm) – от ултравиолетовата (UV) до инфрачервената област; дълго време на живот във възбудено състояние (20-40 ns – срещу 1-10 ns за органичните флуорофори); голямо Стоксово отместване (над 100 nm) между дължината на вълната на възбуждане и максимума на емисия; висока стабилност на фотообезцветяване (няколко хиляди пъти по-стабилни от органичните флуорофори); изключителна стабилност на фотохимично разграждане, което ги прави подходящи за продължителни измервания в рамките на часове [[Fernee et al., 2006](#); [Tajalli et al., 2008](#); [Christie et al., 2009](#)]. Всички тези характеристики правят наночастиците много по-ярки (~10-100 пъти) от съществуващите досега органични флуоресцентни проби в условията на *in situ* и *in vivo* визуализиране [[Bruchez et al., 1998](#); [Chan & Nie, 1998](#); [Wu et al., 2003](#)], където пречупването, отразяването и поглъщането на светлината от тъканите е изключително голямо [[Kuno et al., 2001](#); [Larson et al., 2003](#); [Michalet et al., 2005](#)].

Уникалните оптични свойства на QD могат да бъдат използвани за оптимизиране на съотношението

сигнал/фон и за подобряване чувствителността на флуоресцентните анализи *in vitro* и *in vivo*. Стабилността на QD на фотообезцветяване позволява дълго време на скениране, получаване на много последователни изображения във фокалната равнина и тяхната реконструкция в 3D-проекция с висока резолюция.

Най-атрактивната характеристика на QD за биомедицинска диагностика е **възможността да бъдат използвани за едновременното регистриране на няколко таргета (т.нар. мултиплексен флуоресцентен анализ)**. За целта се използват едновременно наночастици с различни размери (респективно, флуоресценция в различни диапазони на спектъра) при една и съща дължина на вълната на възбуждащата светлина [Goldman et al., 2004; Chan et al., 2005; Sweeney et al., 2008]. Възможността за мултиплексен анализ е уникално свойство на QD и не е присъщо за органичните флуорофори. Дължи се на обстоятелството, че всички наночастици имат много широк спектър на възбуждане, който започва от ултравиолетовата зона (Фигура 2С). За имиджинг на няколко различни органични флуорофора е необходимо да се използват поне няколко линии на възбуждане с различна дължина на вълната. Всяка линия на възбуждане ограничава детекцията на близките до нея емисионни спектри. Освен това, органичните флуорофори се характеризират най-често с широки емисионни спектри, които се припокриват един-друг при едновременната им детекция [Lakowicz, 1994; Zollinger, 2004; Resch-Genger et al., 2008]. Изключително широкият спектър на възбуждане и тесен спектър на емисия на квантовите точки (Фигура 2А,С) дава възможност за едновременното възбуждане на нанокристали с различна емисия, използвайки един единствен източник на възбуждане при фиксирана дължина на вълната (Фигура 3В).



**Figure 3.** (A, B) Simplified scheme of the excitation/emission Stokes-shifts of conventional organic fluorophore and QD – an important characteristic for overcoming of background fluorescence (e.g., tissue autofluorescence). (C) Overlapping of mouse skin autofluorescence with the fluorescence of QD<sup>520</sup> and QD<sup>650</sup> [(C) is according to Gao et al., 2004].



Голямото Стоксово отместване между възбуждащата и излъчената от QD светлина ги прави **изключително подходящи за флуоресцентен имиджинг анализ *in vivo*** [Ballow et al., 2004; Gao et al., 2004; Kim et al., 2004]. Това позволява да се сведе до минимум автофлуоресценцията на живите обекти, чийто максимум е непосредствено след дължината на вълната на възбуждане (Фигура 3B,C) [Anderson-Engels et al., 1997; Frangioni, 2003; Rao et al., 2007]. Органичните флуорофори се характеризират обикновено с твърде малко Стоксово отместване, което води до припокриване на емисионните им спектри с автофлуоресценцията на живите обекти (Фигура 3A).

Зависимият от размера на наночастиците тесен емисионен спектър на QD ги прави подходящи за **образуване на FRET-двойки с органичните флуорофори** [Clapp et al., 2004; Medintz et al., 2005; Sapsford et al., 2006a]. Това обуславя бързото навлизане на FRET-анализите в диагностиката (засега в разработването на *in vitro* тестове).

Друго атрактивно свойство на флуоресцентните наночастици е **възможността за имиджинг анализ на единични молекули** (т.нар. “single-molecule bioanalysis”) [Lacoste et al., 2000; Dahan et al., 2003; Bentolila et al., 2008; Qian & Nie, 2008]. Единични наночастици могат да бъдат визуализирани в продължение на няколко часа с помощта на различни флуоресцентни техники, без да изгубят флуоресцентния си сигнал [Lacoste et al., 2000; Dahan et al., 2003]. Подобна детекция е невъзможна при използване на съществуващите конвенционални органични флуорофори, които се характеризират с бързо фотохимично разграждане, съпроводено с фотообезцветяване.

Изброените по-горе фотофизични и физикохимични характеристики на QD разкриват неоспоримите им предимства пред конвенционалните органични флуорофори в бъдещето на биомедицинската диагностика *in vitro* и *in vivo*. Понастоящем, обаче, разработването на QD-проби за флуоресцентен имиджинг на биологични обекти е в зората на своето развитие и нашият колектив е един от пионерите в тази област. Процесът на синтез е все още бавен и скъп, съпътстван от редица трудности, свързани със запазване на квантовия добив на водоразтворимите наночастици, намаляване на техните размери, повишаване на тяхната колоидна стабилност във физиологични разтвори и гарантиране на биопоносимост и ниска токсичност. Тези трудности трябваше да бъдат преодолени, за да се стигне до разработване на QD-проби, които са приложими за флуоресцентна имиджинг диагностика *in vivo*.

Когато започнахме работа в тази област, неизвестните около разработването и възможността за използване на QD в биологични експерименти бяха изключително много. Една от първоначалните цели на всеки един колектив тогава беше да се концентрира върху разработването на оригинални стратегии за моделиране на повърхностната структура на QD-пробите така, че да се намалят максимално нерадиационните електронни преходи на повърхността на нанокристалата (което би осигурило висок квантов добив и отлични контрастни свойства), да се повиши фотохимичната им стабилност и разтворимост във физиологични разтвори и телесни течности и да се гарантира тяхната биопоносимост с оглед на прилагането им за флуоресцентен имиджинг на живи обекти.

## Цели и задачи на дисертационния труд

### ОСНОВНИ ЦЕЛИ:

- Да се разработят стратегии за получаване на биологично-активни нанохибридни проби, на основата на квантови точки, които да бъдат подходящи за флуоресцентни и мултимодални имиджинг анализи.
- Да се покаже на практика приложимостта на тези нови нанохибридни проби за флуоресцентни и мултимодални имиджинг анализи на биологични обекти в *in vivo* или *in vitro* условия и доколко те подобряват възможностите на съществуващите понастоящем конвенционални аналитични методи с флуоресцентна детекция.
- Да се намерят терапевтични приложения на квантовите точки на основата на фотосенсибилизиращите им свойства и да се развият основите на използването им в методите на фотодинамичната терапия.

### ОСНОВНИ ЗАДАЧИ:

- Моделиране на структурата, фотофизичните и физикохимичните свойства на квантови точки от CdSe и CdSe/ZnS с оглед на получаването на високофлуоресцентни водоразтворими наночастици, характеризиращи се с малки размери (съизмерими или по-малки от размерите на повечето биомакромолекули) и висока колоидна стабилност във физиологични разтвори.
- Разработване на многофункционални QD-проби (конюгати QD-лектин, QD-антитяло, QD-олигонуклеотид, QD-биотин) за флуоресцентни имиджинг анализи на биологични обекти (клетки и молекули) в условия *in vitro*.
- Разработване на многофункционални QD-проби за флуоресцентни имиджинг анализи на експериментални животни в условия *in vivo* на базата на квантови точки, капсулирани в дендримери или силика-шел и конюгирани с биопоносими полимери.
- Разработване на нанохибридни проби за мултимодални имиджинг анализи (флуоресцентен имиджинг и MRI) в условия *in vitro* и *in vivo*, на базата на капсулирани в силика-шел QD и хелатори за парамагнитни йони.
- Приложение на QD-пробите в конвенционални *in vitro* флуоресцентни анализи на антигени, разположени на клетъчната повърхност, вътреклетъчни антигени и изолирани антигени с помощта на флуоресцентна конфокална микроскопия, флоуцитометрия и имуноблот. Изследване на възможностите за повишаване на качеството (чувствителност, таргетна специфичност, съкращаване на времето за анализ и др.) на конвенционалните аналитични методи на базата на QD-пробите.
- Приложение на QD-пробите за разработване на FRET-анализи, базиращи се на енергетичния пренос между QD и органични флуорофори. Разработване на FRET-анализ *in vitro* за селекция на антисенс-siRNA секвенции с висок афинитет към таргетната сенс-mRNA.
- Приложение на QD-пробите за визуализиране на тумори в експериментални животни с използване на флуоресцентен имиджинг и MRI. Изясняване на предимствата и проблемите на мултимодалната имиджинг диагностика.
- Изследване на фотосенсибилизиращите свойства на QD-пробите на изолирани клетъчни линии.

## Материали и методи

### I. Материали

#### 1. Химикали, реактиви и китове

QD CdSe и CdSe/ZnS бяха синтезирани по методите, описани в [Bruches et al. \(1998\)](#), [Peng & Peng \(2001\)](#), [Gao et al. \(2004\)](#), [Jose et al. \(2006\)](#), [Zlateva et al. \(2007\)](#). Наночастиците са характеризирани с UV/VIS и флуоресцентна спектроскопия, X-ray анализ (Rigaku RINT-2100, Япония), трансмисионна електронна микроскопия (TEM) или TEM с висока резолюция (HRTEM). В работата са използвани: (i) водоразтворими, карбокси-функционализирани QD CdSe с широк спектър на възбуждане (от 300 до 500 nm) и широк спектър на флуоресцентна емисия (от 500 до 650 nm); (ii) водоразтворими, карбокси-функционализирани QD CdSe/ZnS с тесен спектър на емисия (с  $\lambda_{em}^{max}$  на 580 nm); (iii) водоразтворими, amino-функционализирани QD CdSe/ZnS с тесен спектър на емисия (с  $\lambda_{em}^{max}$  на 565, 605 и 655 nm), капсулирани в силика-шел; (iv) QD CdSe/ZnS с тесен спектър на емисия (с  $\lambda_{em}^{max}$  на 485, 565, 605 и 655 nm), опаковани в PAMAM-дендримери по метода на [Wu et al. \(2003\)](#) [с модификация; използване на PAMAM-C12 дендример (генерация 2; C<sub>238</sub>H<sub>480</sub>N<sub>58</sub>O<sub>36</sub>; Sigma-Aldrich – Cat. #536849) вместо октиламин-модифицирана полиакрилна киселина]. Омрежването на amino-функционализираните PAMAM-дендримери на повърхността на QD извършвахме по карбодиимиден метод с използване на EDC като свързващ агент и карбокси-функционализиран PAMAM дендример (PAMAM-COOH; генерация 2, Sigma) като омрежващ агент. Капсулираните в омрежени дендримери наночастици бяха пречиствани чрез спин-ултрафилтрация (филтри Vivaspin PES, Sartorius).

Конюгирането на карбокси-функционализирани наночастици с протеини, amino-модифицирани олигонуклеотиди и метил-PEG<sub>n</sub>-амин (n=24) беше осъществено по карбодиимиден метод, с използване на EDC (EDAC) като свързващ агент. Конюгатите QD-протеин, QD-олигонуклеотид и QD-PEG бяха пречиствани с двустепенна спин-ултрафилтрация, с използване на филтри Vivaspin PES (Sartorius) или полипропиленови филтри Pall Nanosep (Sigma-Aldrich). Ковалентното свързване на капсулирани в силика-шел и amino-функционализирани QD-наночастици с метил-PEG<sub>n</sub>-NHS естер (n=8, 12 или 24) или DOTA-фенил-изотиоцианат/Gd<sup>3+</sup> беше осъществено по метод, описан в *Bioconjugate Techniques* [[Hermanson, 1996](#)]. Конюгатите QD-PEG бяха пречиствани чрез спин-ултрафилтрация (филтри Vivaspin PES, Sartorius), а QD-DOTA – чрез диализа с използване на диализни касети Slide-A-Lyzer® (Pierce). Концентрацията на Gd<sup>3+</sup> в пробата беше определяна чрез <sup>1</sup>H-MRI. Данните от MRI анализа бяха обработвани с MRVision Image Analysis софтуер.

В работата бяха използвани също: соев аглутинин (SBA), SBA белязан с флуоресцеин изотиоцианат (FITC-SBA) и аглутинин от пшеничен зародиш (WGA) (Sanwa, Япония); антитела – анти-CD90 и анти-β-актин (Sigma-Aldrich), анти-ламин A/C (Qiagen), FITC-анти-c-abl (Invitrogen); amino-модифицирани олигонуклеотиди (Fidelity Systems Inc., USA); CNBr-активирана Sepharose® 6MB (GE Healthcare); метил-PEG<sub>n</sub>-NHS естер и метил-PEG<sub>n</sub>-амин (n=8, 12, или 24; ThermoScientific, USA); N-(3-диметиламинопропил)-N'-етилкарбодиимид хидрохлорид (EDC, Sigma-Aldrich); 1-етил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид хидрохлорид (EDAC, Invitrogen); DOTA-фенил-изотиоцианат (Macrocyclics Co., USA); клетъчна среда RPMI-1640 (Gibco); лимфосепар I (IBL, Takasaki, Япония); bcr-abl p210 mRNA (InVicoScribe Technologies, US); трифлуоперазин (TFPZ, Sigma-Aldrich); сулфониран алуминиев фталоцианин (SALPC, Ciba Gaigy); пропидиум йодид (PI, Sigma);

тетраметилпродамин етилов естер (TMRE, Immuno Chemistry Technologies, US)

Използвани бяха и голям брой други химикали и реактиви – търговски продукти на Wako (Япония), Sigma-Aldrich и Invitrogen, както и китове на фирмите Pierce, Invitrogen, Agilent Technologies, Immunotech, Promega и Cell Biolabs Inc.

## **2. Клетъчни култури**

В работата бяха използвани: Jurkat и MOLT-4 (от пациенти с остра лимфобластна левкемия), K562 (от пациенти с хронична миелоидна левкемия), Raji и Daudi (от пациенти с лимфома на Burkitt), Colon26 (от пациенти с рак на дебелото черво). Всички клетъчни линии бяха предоставени от Hayashibara Biochem. Lab. (Окаята, Япония). В работата бяха използвани и лимфоцити, изолирани от кръв на здрави доброволци.

## **3. Опитни животни**

Мишки Balb6 (средно тегло 25 g); плъхове Sprague-Dawley (средно тегло – 200 или 325 g). Всички експерименти с животни са проведени в съответствие с изискванията на Физиологичното дружество на Япония и са с разрешението на Комитета за използване и закрила на животните при Националния институт за радиологични изследвания на Япония.

# **II. Препаративни методи**

## **1. Отглеждане на клетъчни култури от ракови клетки**

Раковите клетки бяха култивирани в клетъчна среда RPMI-1640, съдържаща термоинактивиран серум и антибиотици, в атмосфера с висока влажност, наситена с 5% CO<sub>2</sub>, при 37 °C. Непосредствено преди началото на всеки експеримент клетъчната среда беше подменяна с нова, несъдържаща антибиотици.

## **2. Изолиране на лимфоцити от кръв**

Беше използвана хепаринизирана кръв от здрави доброволци и сепариращ разтвор (Lymphosepar I). Изолираните лимфоцити бяха ресуспендирани в клетъчна среда RPMI-1640 и съхранявани до 2 седмици в инкубатор при същите условия на култивиране. В рамките на този срок клетките бяха използвани за различни анализи.

## **3. Приготвяне на Cy5-белязана mRNA**

Cy5-белязана bcr-abl mRNA беше получена и пречистена по РНК-амплификационен протокол, описан в инструкцията на *Low RNA Input Fluorescence Linear Amplification kit* (Agilent Technologies). Всички разтвори, използвани в този метод, бяха приготвяни в суперчиста вода, в която не се регистрират РНК-азна и ДНК-азна активности.

## **4. Фракциониране на левкемични от нормални лимфоцити с лектин-афинитетна хроматография**

За приготвяне на лектин-афинитетната колона беше използвана CNBr-активирана Sepharose<sup>®</sup> 6MB, конюгирана със SBA по метода на [Bakalova & Ohba \(2003\)](#). За елуиране на нормалните лимфоцити, които не се задържат върху носителя, беше използван PBS. Левкемичните лимфоцити, взаимодействащи с имобилизирания върху гела лектин, бяха подлагани на постепенно конкурентно елуиране с използване на PBS, съдържащ N-ацетил-D-галактозамин в нарастваща концентрация (0-0.4 M). Наличието на клетки във всяка една фракция беше определяно спектрофотометрично. Видът на клетките във фракциите беше определян чрез флуоресцентна конфокална микроскопия и флуориметрия с използване на PE-CD44 и

QD<sup>525</sup>-CD90 антитела, специфични съответно за нормалните и левкемичните лимфоцити.

#### **5. Облъчване на клетки с ултравиолетова светлина**

Беше използвана експериментална схема, осигуряваща облъчване със светлина с нисък интензитет без значително загряване на пробата (отдолу - нагоре): живачна лампа – UV-филтър (задържащ лъчите под 340 nm) – кварцова платформа – кювета с клетъчна суспензия. Облъчването беше провеждано при режим: 10 min облъчване, 10 min прекъсване на облъчването, с обща продължителност на облъчването 30 min.

### **III. Аналитични методи**

#### **1. Флуоресцентна конфокална микроскопия и флоуцитометрия на живи клетки**

Клетките бяха инкубирани с конюгати QD-лектин или QD-антитяло в различни времеви интервали, отмити с PBS и подложени на анализ. Взаимодействието на клетките със съответния конюгат беше регистрирано чрез флуоресцентна конфокална микроскопия или флоуцитометрия. За целта бяха използвани микроскоп Olympus IX70 или флоуцитометър Beckman Coulter-Epics XL при режим на работа, позволяващ диференциране на клетките в зависимост от техния обем и структура, както и в зависимост от интензитета на тяхната флуоресценция. Данните от флоуцитометричния анализ бяха обработвани с XL System II софтуер.

#### **2. Флуоресцентна конфокална микроскопия и флоуцитометрия на фиксирани клетки**

Клетките бяха фиксирани с *IntraPrep Permeabilization Reagent* (Immunotech) (5.5% формалдехид – за фиксиране, и 0.1% натриев азид – за повишаване на проникваемостта) и инкубирани с QD-белязани антитела (anti-Lamin A/C, anti-β-actin или anti-c-abl). Взаимодействието на антитялото с вътреклетъчния антиген беше регистрирано с флуоресцентна конфокална микроскопия или флоуцитометрия. За целта бяха използвани микроскоп Olympus IX70 или флоуцитометър Beckman Coulter-Epics XL. Сортирането на клетките на флоуцитометъра беше провеждано на базата на интензитета на тяхната флуоресценция – маркер за количеството на таргетния антиген (c-abl тирозин-киназа) в цитоплазмата. Данните от флоуцитометричния анализ бяха обработвани с XL System II софтуер.

#### **3. FRET анализ на хибридизацията между QD-siRNA и Cy5-mRNA**

Cy5-mRNA хибридизира с QD<sup>580</sup>-siRNA в продължение на 1 h при 65 °C. Реакционната смес беше подлагана на FRET анализ с използване на спектрофлуориметър Shimadzu RF5000 ( $\lambda_{ex}=420$  nm;  $\lambda_{em}=490-700$  nm). Ефективността на FRET ( $E$ ) беше пресметната по следното уравнение:

$$E = 1 - F_{DA}/F_D$$

където  $F_{DA}$  и  $F_D$  са съответно флуоресценцията на QD (донор на енергия) в присъствие и отсъствие на Cy5 (акцептор на енергия).

#### **4. Хибридизационен анализ (PicoGreen Test)**

За оценка на хибридизацията между cDNA и oligo-DNA беше използван спектрофлуориметричен PicoGreen тест (*Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kit*, Invitrogen) ( $\lambda_{ex} = 480$  nm;  $\lambda_{em} = 520$  nm).

#### **5. Анализи за цитотоксичност**

##### **5.1. CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Test™ (Promega)**

Методът се базира на луциферазна реакция, съпроводена с излъчване на светлина (хемилуминисценция). Хемилуминисценцията на пробите беше регистрирана на IntraMed Immunomini

NJ-2300 скениращ хемилуминометър за работа с 96-гнездови плаки.

## **5.2. Флоуцитометричен анализ за цитотоксичност**

Клетките бяха инкубирани с PI, утаени чрез центрофугиране, измити двукратно с PBS и анализирани на флоуцитометър Beckman Coulter–Epics XL. Режимът на работа позволяваше едновременното преброяване на мъртвите и живите клетки и тяхното разграничаване в квадранти, отговарящи на PI-оцветени и силно флуоресциращи мъртви клетки и неоцветени и много слабо автофлуоресциращи живи клетки. Данните бяха анализирани с XL System II софтуер.

## **6. Флуоресцентен анализ на митохондриалния потенциал**

Флуоресцентният анализ на митохондриалния потенциал беше провеждан по метода, описан от [Wong & Cortopassi \(2002\)](#), с използване на TMRE като флуоресцентен маркер и флуоресцентен Microplate Reader (BioRad), снабден с контрол на температурата.

## **7. Анализ на малоновия диалдехид**

За целта беше използван *OxiSelect TBARS Assay Kit*<sup>TM</sup> (Cell Biolabs Inc., US). Анализът се базира на взаимодействието на малоновия диалдехид (МДА) с тиобарбитуровата киселина (ТБК) с образуване на цветен комплекс, флуоресциращ при  $\lambda_{ex} = 540 \text{ nm}$  и  $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$ .

## **8. Имуноблот анализи**

В работата бяха използвани класически имуноблот анализ на протеини с хемилуминисцентна детекция (с използване на моноклонално антитяло и HRP-белязано поликлонално антитяло) и QD-базиран имуноблот анализ с флуоресцентна детекция (с използване на QD-белязано моноклонално антитяло или биотин-белязано моноклонално антитяло и QD-белязан биотин/неутравидин).

## **9. Флуоресцентен микроскопски анализ на мозъчната циркулация в експериментални животни с използване на дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия**

Животните (плъхове) бяха подлагани на анестезия с изофлуран и микрохирургични манипулации (канюлиране на опасната вена и феморалната артерия, интубиране и изтъняване на скалпа над соматосенсорната зона на кортекса). По време на експеримента беше извършван постоянен контрол на средното артериално кръвно налягане и сърдечния ритъм. За визуализиране на кръвоносните съдове в мозъка (преди и след инжектиране на QD-проба) беше използван флуоресцентен микроскоп, работещ в режим на дву-фотон възбудена флуоресценция (Leica SP5) при  $\lambda_{ex}=810 \text{ nm}$  и различни режими на емисия в зависимост от спектралните характеристики на QD-пробите.

## **10. Флуоресцентен имиджинг анализ *in vivo***

В експериментите бяха използвани мишки – здрави животни (за изследване на фармакодинамиката на QD-пробите) и животни-тумороносители (за флуоресцентно визуализиране на тумори с QD-проби). Животните бяха подлагани на анестезия с изофлуран и флуоресцентен имиджинг анализ преди и след инжектиране на съответната QD-проба. За целта беше използвана IVIS Imaging система, при филтър на възбуждане  $450\pm 30 \text{ nm}$  и филтър на емисия  $650 \text{ nm}$ . Данните бяха обработвани с Living Image<sup>®</sup> софтуер.

## **11. MRI *in vivo***

В експериментите бяха използвани мишки-тумороносители. Животните бяха подлагани на анестезия с изофлуран и MRI (спин-ехо) преди и след инжектиране на QD-пробата. За целта беше използван 7 Tesla MRI (Kobelco, Japan). Данните бяха обработвани с MRVision Image Analysis<sup>®</sup> софтуер.

## Експериментални резултати и дискусия

### **I. Зависимост на фотолуминисцентните свойства на QD от повърхностните свойства на нанокристалите. Подбор на условията на синтез и постсинтетична обработка за получаване на най-подходящи за биоимиджинг QD**

При започване на работа по темата на дисертационния труд, се смяташе, че типът на кристалната решетка на QD и структурата на повърхността ѝ са двата основни фактора, определящи флуоресцентните им характеристики и обезпечаването на висок, възпроизводим и стабилен квантов добив, а хомогенността на размера на наночастиците в популацията обуславя тесния им характеристичен емисионен спектър. Високият квантов добив и тесният емисионен спектър са основните характеристики, които се търсят при използване на флуоресцентните проби (маркери) за имиджинг анализи в биомедицинските изследвания. Експерименталният опит по това време показваше, че колкото по-висока е температурата на нуклеиране и растеж на QD, толкова по-добри са техните физикохимични и фотофизични свойства като кристалинност, квантов добив и FWHM (характеризиращ остротата на флуоресцентния пик и произтичащ пряко от хомогенността на размерите на наночастиците в популацията). Като правило се беше наложило схващането, че е добре да се използват температури на синтез над 300 °C, тъй като над тази температура се получават QD с преобладаваща вюртцитна структура на кристалната решетка, която се характеризира с фокусирана флуоресцентна емисия с висок интензитет [Dabbousi et al., 1997; Qu & Peng, 2002; Chen et al., 2005; Lu et al., 2005].

От друга страна, обаче, контролируемостта на процеса на нуклеиране и растеж на кристалите при такава висока температура беше изключително ниска и синтезата беше почти невъзпроизводима – не беше възможно да се получат наночастици с едни и същи флуоресцентни характеристики в две последователни и независими синтетични процедури. Търсеха се нови подходи и способности за синтез, които: (i) да повишат репродуктивността на процеса и да гарантират получаването на едни и същи по размер и флуоресцентни свойства наночастици; (ii) да доведат до получаване на няколко популации (фракции) по размери и флуоресцентни характеристики QD в рамките на един и същ процес; (iii) да съкратят рязко остатъците от токсичните кадмиеви субстанции; (iv) да повишат сигурността на работа и сведат до минимум риска от боравене с високотоксичните прекурсори.

От значение беше също състоянието на повърхността на наночастиците и свързаната с нея разтворимост и стабилност на колоидните им свойства в органични и водни среди. Тази стабилност и разтворимост има две основни значения: (i) използваемостта им в биологични системи е възможна само при условие, че те са в състояние на напълно диспергирани и отделени една от друга частици в разтвора; (ii) когато наночастиците загубят своята 100-процентна колоидна диспергируемост, губят и флуоресцентните си свойства поради нарушаване на квантовото ограничение в кристалното ядро.

Освен това имаше основания да се счита, че високата температура на нуклеиране и растеж на наночастиците благоприятства не толкова кристалната им структура, отколкото повърхностните им свойства и тези свойства са по-скоро фактора, определящ високия интензитет на флуоресценция на QD [Rogach, 2007].

В литературата се очертаваха три основни подхода за реализиране на всички тези изисквания:

- Избор на по-ниско реакционноспособни и по-малко токсични кадмиеви прекурсори. Целта е да се намали скоростта на растеж на кристалите до нива на контролируемост, както и да се сведе до минимум рискът от боравене с високотоксичния прекурсор диметилкадмий.

- Използване на по-мощни (по-силни) координационни лиганди, като целта беше същата – да се намали скоростта на растеж на нанокристалите до нива на контролируемост, като се подтисне процеса на разфокусиране на размера и Оствалдовия растеж. Освен това, по-силните координационни лиганди осигуряват и по-висока колоидна стабилност на нанокристалите.
- Използване на по-ниски температури за нуклеиране и растеж на нанокристалите с последващо модифициране на повърхността им – пасивиране. По това време се считаше, че ниските температури на синтез водят до понижен квантов добив, който може да се повиши вторично чрез повърхностно пасивиране и/или изграждане на неорганичен шел от елементи с по-голяма ширина на забранената енергетична зона [Alivisatos, 1996; Hines & Guyot-Sionnest, 1996].

Нашият колектив също даде своя принос в тези три направления, като работата ни се увенча с няколко изключително ценни постижения:

(1) Успяхме да получим наночастици, характеризиращи се с широка "deep-trap" флуоресценция, висок квантов добив и много малки и хомогенни размери на кристалното ядро, като за целта използвахме много ниска температура на нуклеиране и растеж (~25 °C).

(2) Намерихме условия за контролиран растеж и нуклеиране на нанокристалите и минимизиране на Оствалдовата рекристализация и създадохме процес на контролирано нарастване на диаметъра на кристалното ядро. При този процес получихме високофлуоресцентни QD в бавнонарастващ температурен градиент. Подбраните условия на градиентно нарастване на температурата даваха възможност за последователно изолиране на много (поне 6) QD-фракции (всяка една от които беше хомогенна по размер и фотофизични свойства) в един единствен синтетичен процес. Това направи възможно едновременната синтеза на много фракции монодисперсни QD с много добри и възпроизводими фотофизични характеристики.

## **1. Фотофизични и физикохимични характеристики на наночастици CdSe с „deep-trap” флуоресценция, получени при нуклеиране и растеж на „стайна температура” (~25°C)**

През 2004-та година имахме уникалната възможност да разработим метод за нуклеиране и растеж на нанокристали CdSe при „стайна температура” (~25 °C) и отсъствие на силни координационни лиганди. Получихме една хомогенна по размер QD-фракция с уникални фотофизични и физикохимични характеристики.

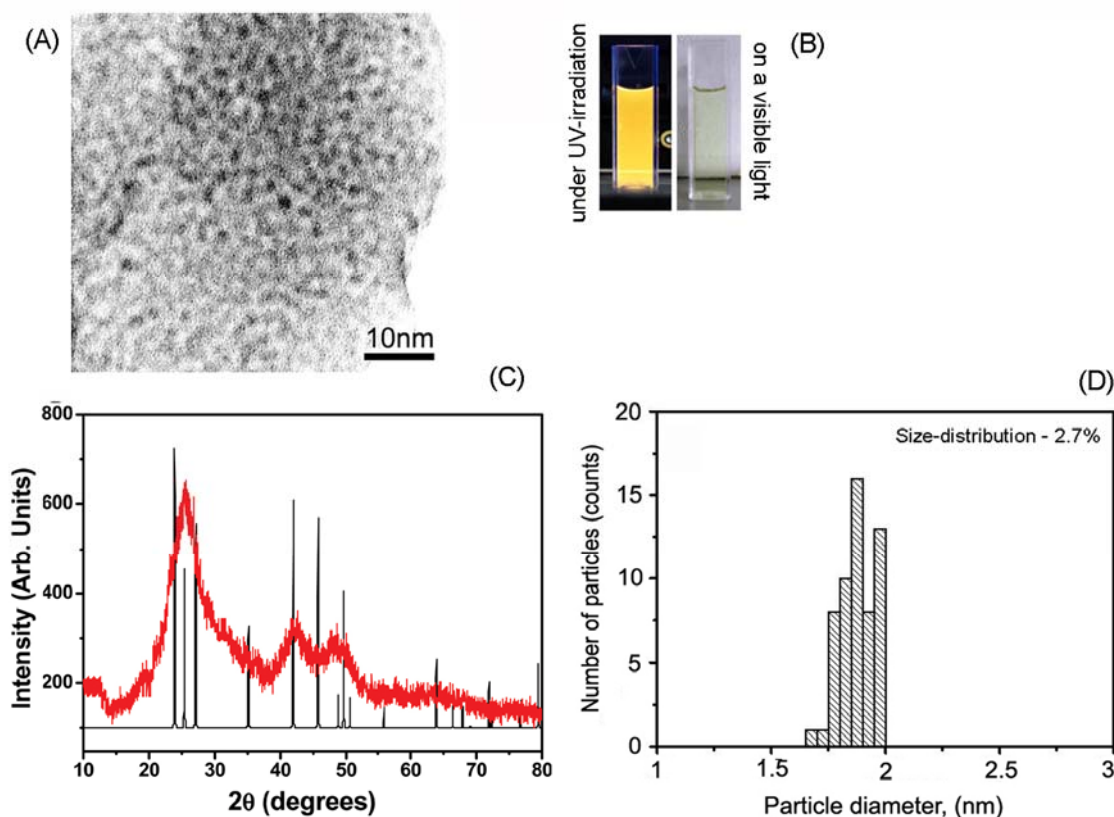
Данните от рентгеноструктурния анализ на наночастиците (**Фигура 4C**) показваха наличието на няколко широки дифракционни пика, което затрудняваше разграничаването на сфалеритната от вюртцитната структура на кристалната решетка и дефинирането на точната структура на получените от нас нанокристали. Може да се твърди, с известно приближение, че нанокристалите CdSe се характеризират предимно с кубична, плътно опакована сфалеритна структура. Характерните пикове на равнините (111), (220) и (311) на сфалерита в рентгенограмата на CdSe, снета за стойности на  $2\theta$  от 20°-80°, се наблюдават при 25.38°, 42.06° и 49.76°. Наблюдават се и по-слаби пикове, отговарящи на равнини в нанокристали с вюртцитна структура. Оценени по относителната интензивност на рефлексите в тези рентгенограми, обаче, вюртцитните нанокристали CdSe не са доминиращи (съставляват по-малко от 10%).

Кристализирането на CdSe в кубична структура би могло да се отдаде на ниската температура на нуклеиране и растеж (~22-25 °C). Общоприето е схващането, че CdSe кристализира предимно в кубична (сфалеритна) структура при температури на анелиране под 200 °C, а хексагоналната (вюртцитна) структура



доминира при температури на анелиране по-високи от 300 °C [Dabboussi et al., 1997; Rogach et al., 1999; Qu & Peng, 2002; Chen et al., 2005; Lu et al., 2005;]. В някои случаи, обаче, при ниски температури на нуклеиране и растеж на нанокристали CdSe, прекомерното изтъняване на пиковите в равнините (102) и (103) на вюртцита в рентгенограмата могат да бъдат резултат от натрупването на сфалеритни дефекти по протежението на (002) оста, което е типично за вюртцитните (клас II-VI) нанокристали [Dabboussi et al., 1997; Talapin et al., 2004].

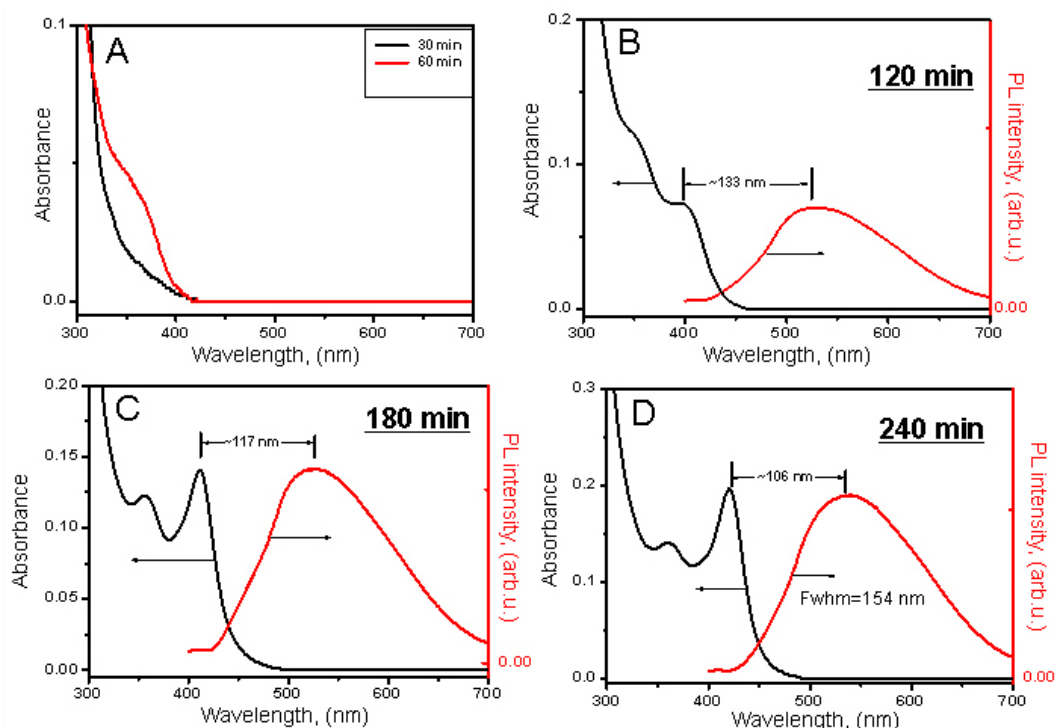
Данните от трансмисионната електронна микроскопия показваха, че изолираната CdSe фракция се състои от еднородни по форма и размер, малки наночастици (Фигура 4А). Около 96% от популацията е с размери между 1.8-2 nm в диаметър (Фигура 4D). От хистограмата се вижда, че средният диаметър на наночастиците е 1.9 nm с отклонение ~3%. Подобни стойности за средния диаметър на наночастиците бяха получени и при калкулиране на резултатите от рентгеноструктурния анализ – 1.88 +/- 0.07 nm.



**Figure 4.** Characterization of the size and crystal structure of CdSe nanocrystals, growth at room temperature (Cd:Se = 1:1): (A) HRTEM image of a large population of CdSe nanocrystals; (B) Image of CdSe nanocrystal suspension in chloroform – on a visible light and under UV-irradiation; (C) X-ray diffraction pattern (in red); for comparison, the standard powder diffraction patterns are indicated in black solid lines for the cubic phase (lower axis); (D) size histogram.

За високата хомогенност на размера е показателен и ясноочертаният тесен абсорбционен спектър на диспергираните в органичен разтворител QD CdSe, изолирани на 3-я и 4-я час от инициирането на реакцията при „стайна температура”. **Фигура 5** представя еволюцията на абсорбционния спектър с времето на растеж на наночастиците. На 60-та минута от началото на реакцията се наблюдава слабоизразен пик около 360 nm, който е характерен за електронните преходи от типа „НОМО-LUMO”. След 120-та минута, абсорбционният спектър добива ясноочертана структура с много добре дефинирани първи и втори пик на екситона. Вижда се също, че в

интервала 60-240 min от началото на реакцията, първият пик на екситона се измества вдясно (в по-дълговълновата област на спектъра) – от 364 до 419 nm. Това изместване на пика е резултат от нарастването на размера на наночастиците и е следствие от ефектите на квантовото ограничение. Изхождайки от абсорбционните спектри на Фигура 5, беше установено, че диаметърът на наночастиците нараства от 1.19 nm (на 60-та минута от иницирането на реакцията) до 1.74 nm (на 240-та минута). FWHM на първия пик на екситона в абсорбционния спектър се редуцира от ~47 nm до ~26 nm, което съответства на отклонение от средния размер от ~4.6% до ~2.7%. Високата хомогенност на размера предполага много тесен емисионен спектър на QD CdSe (с FWHM <40 nm). Фигура 5, обаче, показва че QD, синтезирани при описаните условия на „стайна температура”, се характеризират с широк емисионен спектър (FWHM ~150 nm), чиято физична природа ще бъде дискутирана в края на раздела.

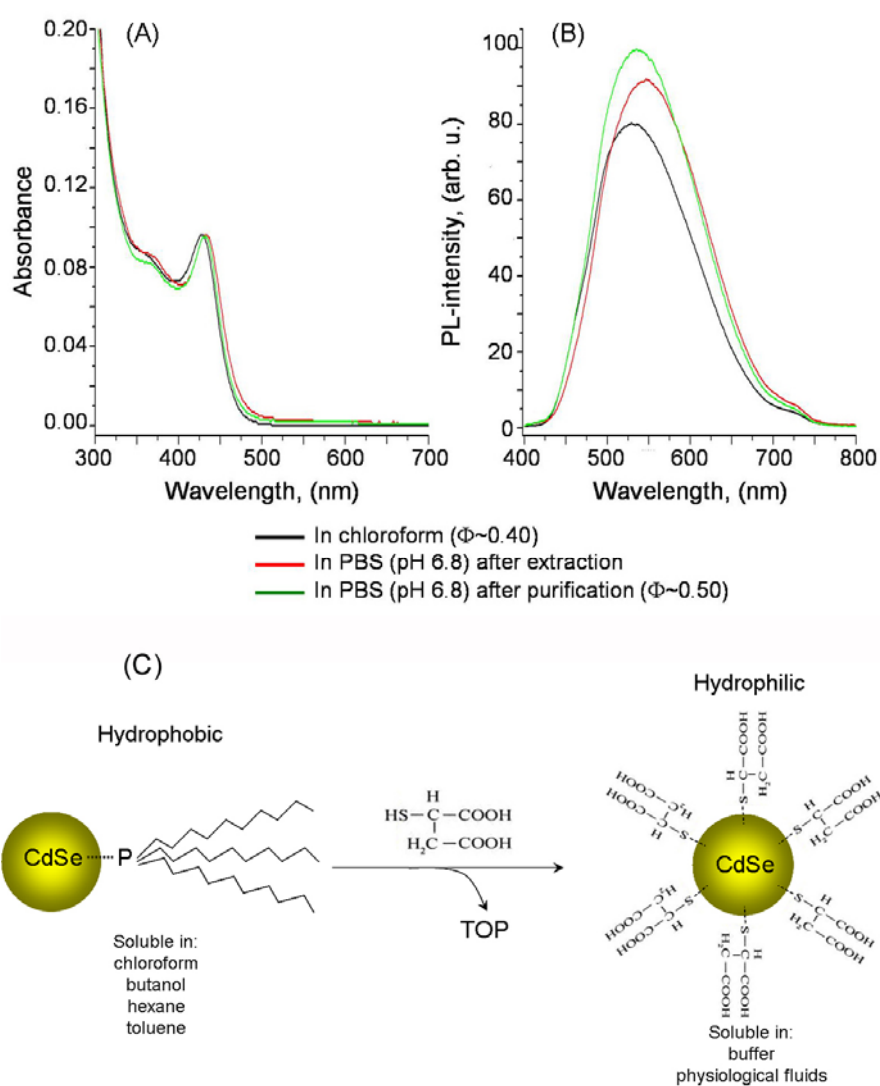


**Figure 5.** Temporal evolution of absorption and emission spectra of CdSe nanocrystals during the growth at room temperature. The spectra were recorded after dispersion of aliquots from the reaction mixture in 1-butanol. The fluorescence spectra were recorded at  $\lambda_{ex} = 365$  nm.

Най-интригуващото свойство на получените при „стайна температура” QD CdSe, беше изключително високата им водоразтворимост, придружена със запазване и дори леко повишаване на квантовия добив във водна среда (от 40-44% в хлороформ до 50-55% в 100-150 mM PBS, pH 7.4), без пост-синтетично пасивиране на повърхността на кристалните ядра с неорганичен или органичен шел (**Фигура 6B**). Една от най-вероятните причини за високата водоразтворимост на тези наночастици CdSe е използването само на TOP като координационен лиганд. TOP образува лабилни връзки с повърхността на нанокристал, за разлика от по-здоровсвързания се лиганд ТОРО, който се използва широко в конвенционалните методи за синтеза на QD CdSe. Прехвърлянето на наночастиците от органична във водна фаза извършвахме чрез иновативен метод на екстракция с използване на водоразтворими меркаптопроизводни за модифициране на повърхността на QD и

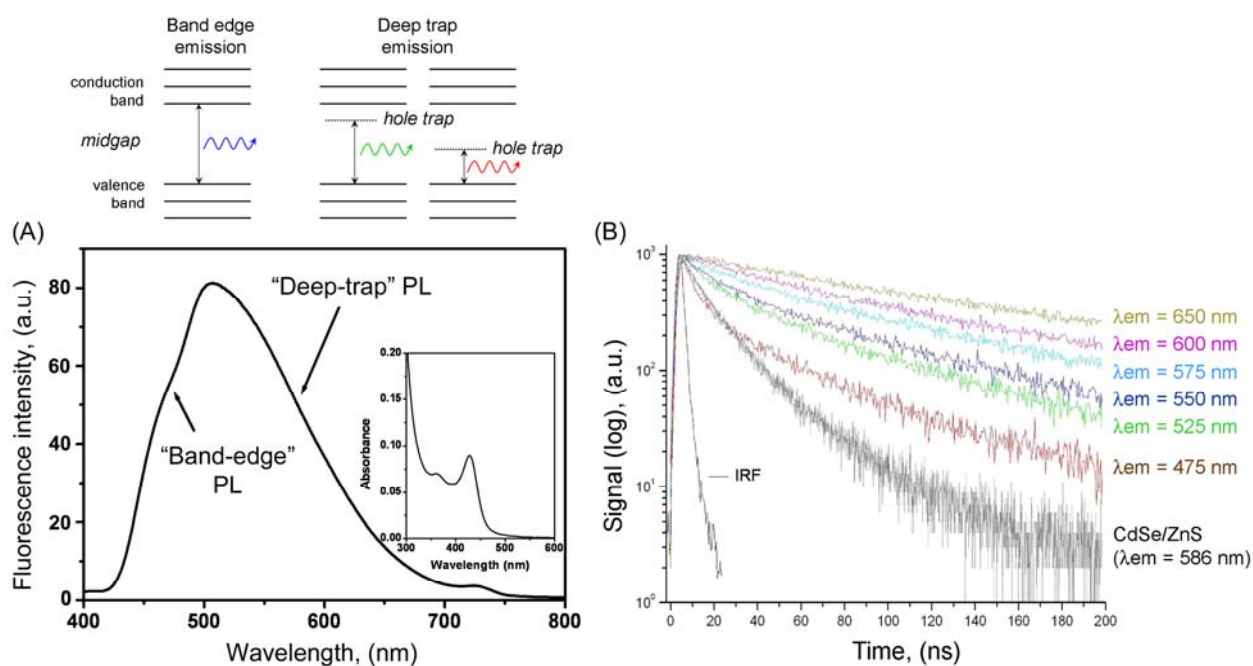
повишаване на техния афинитет към водната фаза (Фигура 6С). Механизмът на тази замяна на повърхностните лиганди се състои в това, че меркапто-съединенията са едни от най-силните металокомплексиращи агенти. Те изместват слабосвързания към повърхността на наночастицата TOP и ѝ придават хидрофилни свойства, дължащи се на полярните карбоксилни групи.

Това са първите, описани в литературата, високофлуоресцентни QD CdSe, синтезирани в органичен разтворител и прехвърлени във високосолеви буферен разтвор без каквато и да е пост-синтетична обработка на повърхността – само чрез директно модифициране с хидрофилен меркапто-лиганд. Това ги правеше и най-малките високофлуоресцентни водоразтворими QD CdSe, описани в литературата до 2006-та година [Zhelev et al., 2006]. Водоразтворимите QD CdSe се характеризираха с висока колоидна стабилност при диспергирането им в PBS. Агрегация не беше регистрирана в течение на година при съхраняване на 4 °С.



**Figure 6.** (A, B) Absorbance and emission spectra of RT-synthesized CdSe quantum dots, dispersed in chloroform or in phosphate-buffered saline (PBS) before and after purification by spin-ultrafiltration. The fluorescent spectra were recorded at  $\lambda_{\text{ex}} = 420$  nm. (C) Scheme of transfer of RT-synthesized CdSe quantum dots from organic to water phase by surface modification with mercaptosuccinic acid.

Друга необичайна характеристика на QD CdSe, синтезирани при „стайна температура”, беше широкият им емисионен спектър (FWHM  $\sim 150$  nm)(Фигура 6B), съчетан с висока хомогенност на размера (Фигура 6D). Интензивната и широка флуоресцентна емисия най-вероятно се обуславя от „трап”-състоянията на повърхността на наночастиците (Фигура 7A). При малки наночастици, където дължината на координационния лиганд е съизмерима с диаметъра им, къплингът на вибрационните състояния на лиганда с повърхностните атоми, както и колизионната релаксация, могат да доведат до алтернативни пътища за разсейване на енергията, имащи отношение към широката флуоресцентна емисия [Bowers et al., 2005]. Общоприето е, че “band-edge” емисията настъпва при рекомбинация на електрона с неговата дупка, а “deep-trap” емисията настъпва, когато фотогенерирана дупка, намираща се в забранената енергетична зона, прихваща електрон, преди последният да релаксира нерадиационно до основното си състояние [Underwood et al., 2001; Bowers et al., 2005]. Показано е, че с намаляване размера на наночастиците, нараства броят на фотогенерираните дупки в забранената енергетична зона [Underwood et al., 2001]. Като възможна причина за този феномен Bowers et al. (2005) посочват увеличеното съотношение повърхност/обем при намаляване размера на наночастиците. Така, по-голяма популация от фотовъзбудени екситони на повърхността биха релаксирани по пътя на взаимодействие на електроните с генерираните дупки в забранената енергетична зона, което прави този механизъм на радиационна релаксация доминиращ при малките QD CdSe (под 2 nm в диаметър).



**Figure 7.** (A) “Band-edge” and “deep-trap” emission of CdSe quantum dots, synthesized at room temperature. The fluorescence spectrum was recorded at  $\lambda_{ex} = 365$  nm. (B) Time-resolved fluorescence life-time spectra of CdSe quantum dots, synthesized at room temperature, dispersed in chloroform. For comparison, a time-resolved fluorescence life-time spectrum of CdSe/ZnS core-shell quantum dots, synthesized at 240 °C and characterized with tunable “band-edge” fluorescence, was recorded at emission wavelength corresponding to the fluorescence maximum (586 nm). All data were recorded at  $\lambda_{ex} = 365$  nm, frequency 40 kHz, using a Hamamatsu FL920S spectrometer. IRF – instrumental response function of the nanosecond flashlamp.

Динамиката на разделената във времето флуоресцентна емисия (Фигура 7B) също е индикация за двойствената природа на широката флуоресценция на тези наночастици. При фитване на кривите от Фигура 7B с едно- или двуксponentialна функция се наблюдаваха две тенденции: (i) кривата, регистрирана при емисия на 475 nm, не се фитваше с едноксponentialна функция, но се фитваше много добре с двуксponentialна функция, характеризираща се две времена на релаксация на екситона –  $\tau_1 \sim 8$  ns в началото, характерно за бързата „band-edge” флуоресценция, и  $\tau_2 \sim 73$  ns, характерно за по-забавената „deep-trap” флуоресценция; (ii) кривите, регистрирани при емисия на 525-650 nm, се фитваха много по-добре с едноксponentialна функция, с едно сравнително дълго време на релаксация за всяка една дължина на вълната – от 25 до 40 ns, което дава основание да считаме, че този диапазон се характеризира с „deep-trap” флуоресценция.

\* \* \*

В заключение, представените в този раздел експериментални резултати описват QD CdSe с широка „deep-trap” флуоресцентна емисия с висок интензитет, получени при нуклеиране и растеж на „стайна температура”. Синтезата е оригинална и високовъзпроизводима. Защитена е с патент. QD се характеризират с уникални фотофизични и физикохимични свойства: малки и хомогенни размери ( $\sim 2$  nm в диаметър), тесен абсорбционен спектър, широка флуоресцентна емисия (FWHM  $\sim 150$  nm), голямо Стоксово отместване между абсорбционния и емисионния максимуми ( $>100$  nm), висок квантов добив в органични и водни разтвори ( $\sim 40$ -50%), висока колоидна стабилност, дълго време на живот на наночастиците във възбудено състояние (с време на релаксация до  $\sim 40$  ns). Прехвърлянето на наночастиците от органична във водна фаза е придружено със съхраняване на малките им размери и колоидната стабилност, както и съхраняване и дори повишаване на квантовия им добив във високосолеви буферни разтвори при физиологично pH.

Трябва да се отбележи, че широката флуоресцентна емисия на QD обикновено се приема за недостатък в биологичните имиджинг анализи, тъй като не позволява разработването на проби за мултиплексна флуоресцентна детекция. Високото качество на CdSe QD се свързва с тесен емисионен спектър, позволяващ дискретно разделяне на флуоресцентната им емисия от тази на ендогенните или други екзогенни флуорофори. Като се имат предвид, обаче, малките и хомогенни размери и високият квантов добив на водоразтворимите QD, синтезирани при „стайна температура”, както и семплата и високовъзпроизводима синтеза, считаме че тези наночастици са също достатъчно атрактивни за флуоресцентни биоанализи. Малките размери и високият квантов добив позволяват при конюгирането на няколко QD върху една биомакромолекула (например, протеин, ДНК, РНК...) да се постигне усилване на флуоресцентния сигнал, идващ от тази молекула. Това дава възможност за разработването на високочувствителни флуоресцентни анализи, вкл. за детекция на единични макромолекули. Нашият колектив беше първият, който доказва експериментално възможността за получаването на такива QD-конюгати – QD-лектин и QD-антитяло, и прилагането им в *in vitro* анализи с флуоресцентна детекция на биологични таргети (вж. раздел III.1. на *Експериментални резултати*) [Zhelev et al., 2005].

Друго предимство на „deep trap” флуоресциращите QD, синтезирани при „стайна температура” е, че флуоресценцията им може да бъде регистрирана с апаратура, снабдена с какъвто и да е емисионен филтър в диапазона 450-600 nm, което е твърде удобно и икономично. Сравнително дългото време на живот на наночастиците във възбудено състояние при  $\lambda_{em} = 525$ -650 nm позволява разработването на биологични тестове с използване на разделена във времето флуоресценция, които биха били значително по-евтини от тестовете, използващи Eu-комплекси или QD с тесни спектри на емисия.

## 2. Фотофизични и физикохимични характеристики на наночастици CdSe с „band-edge” флуоресценция, получени при контролирани условия на растеж в бавнонарастващ температурен градиент (110-250°C)

Както беше посочено в предговора на раздел I на *Експериментални резултати*, целта на изследователите в началото на столетието беше да разработят подходи за получаването на няколко различни QD-фракции от една реакционна система с висока възпроизводимост на фотофизичните им характеристики в органичен разтворител [дефиниран хомогенен размер, фокусирана („band-edge”) флуоресцентна емисия и висок квантов добив] – подходящи за разработване на вододиспергируеми QD-проби за мултиплексни флуоресцентни анализи. Основният проблем беше контролът върху растежа на нанокристалите чрез забавяне на скоростта на синтез, което включваше и евентуално инхибиране на Оствалдовата рекристализация. Пътищата за решаване на този проблем бяха няколко:

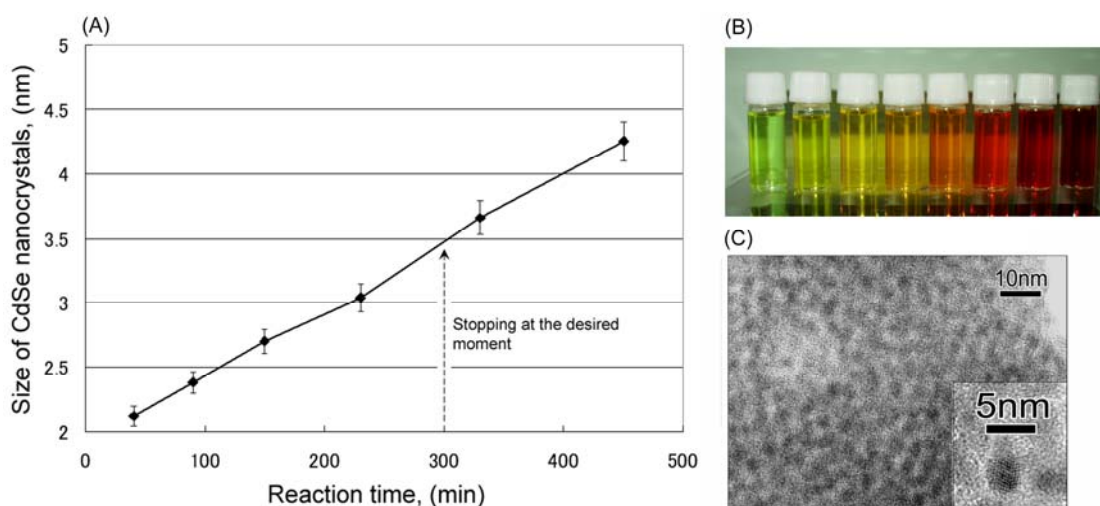
- Избор на по-малко реакционноспособни кадмиеви прекурсори, които са и по-малко токсични.
- Използване на по-мощни координационни лиганди при самата синтеза.
- Използване на по-ниски температури на синтез на кристалните ядра, с последващо модифициране на повърхността им (пасивиране), с цел повишаване на квантовия им добив.

Сравнителният анализ на резултатите, публикувани до 2005-та година, показва, че за всеки един конкретен размер на QD е възможно да се подберат съответните условия – лиганди, прекурсори и определена константна температура, при която да се стопа техния растеж, без да се причиняват нежелани странични ефекти като дефокусиране на хомогенността на размера и флуоресцентната емисия, както и загуба на колоидната им стабилност при продължителното пребиваване на наночастиците в условия на висока температура [Dushkin et al., 2000; Lee et al., 2000; Peng & Qu, 2001; Peng & Peng, 2001; Talapin et al., 2002; Yordanov et al., 2005a]. Това означаваше на практика, че при определена константна температура се стопа процесът на нарастване на частиците, както този, причинен от свободния прекурсор в средата, така и Оствалдовия растеж, водещ до дефокусирането на размера. Този ефект може да се обясни с различната повърхностна енергия на анелиране на прекурсорите при наночастици с различни размери. По-малките частици, поради по-голямото повърхностно напрежение, анелират по-лесно прекурсорите при много по-малка външна енергия (по-ниска температура). Обратно, големите частици присъединяват по-трудно прекурсорите и е необходима по-висока външна енергия за нарастването им. При изролзване на слаби лиганди, този процес не достига до плато и продължава неограничено във времето при константна температура [Yordanov et al., 2005a]. При достатъчно силни лиганди, обаче, процесът на растеж достига до плато при определена константна температура и по-нататъшното нарастване на наночастиците би било възможно само при повишаване на температурата в системата.

Изхождайки от тези предварителни данни, разработихме нов подход и предложихме възможност за много бавен растеж на QD CdSe при бавно градиентно нарастване на температурата, при условие, че прекурсорите в системата не са изчерпани и е стопирано нуклеирането *de novo* по време на растежа. Методът се изразяваше най-общо в инициране на нуклеирането при температури 120-150 °C с незабавно рязко намаляване на температурата до 110 °C и растеж на наночастиците в много бавнонарастващ температурен градиент (от 110 до 250 °C, в продължение на ~7 часа). В работата беше използвана оригинална комбинация от условия (прекурсори, координационни лиганди, съотношение на прекурсорите и др.), които са описани подробно в дисертацията и са от съществено значение за възпроизводимостта на процеса и физикохимичните свойства на получените QD

CdSe.

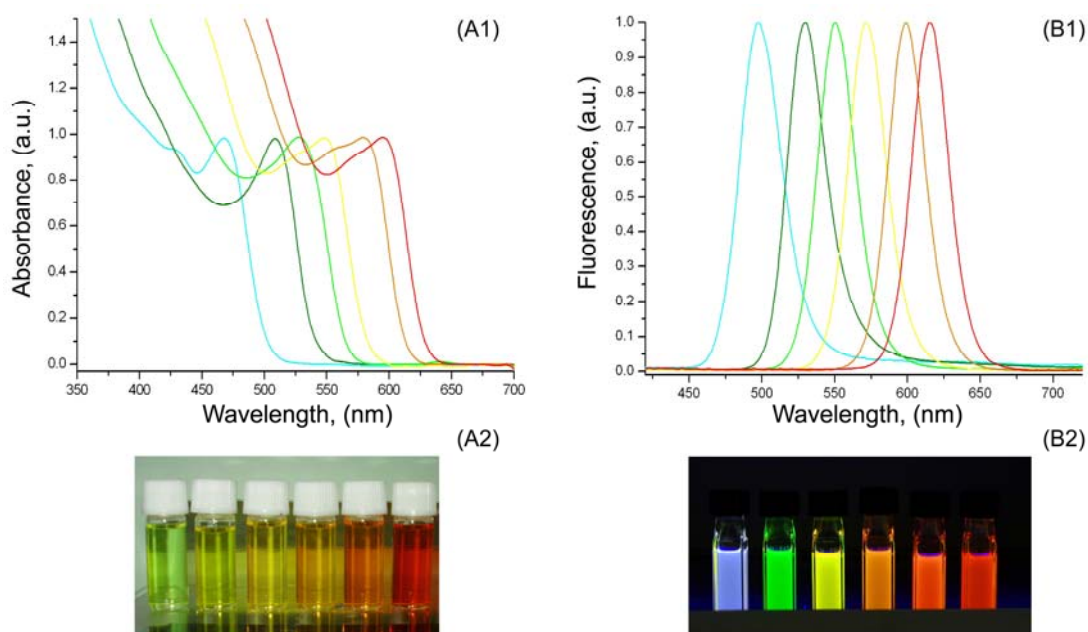
**Фигура 8А** представя кинетиката на растеж на CdSe в условията на бавнонарастващ температурен градиент. Кривата е линейна в продължение на няколко часа, което позволява прецизен контрол на растежа на наночастиците и стопирането му в желан момент чрез отделяне на аликвоти и прехвърлянето им в хлороформ. Бавният растеж на наночастиците и практически пълното потискане на формирането им *de novo* в хода на градиентното повишаване на температурата позволяваше да се отделят монодисперсни по размер фракции с желани фотофизични свойства. Например, за да се изолира фракция с размер  $3.5 \pm 0.1$  nm, реакцията трябваше да се стопира на 6-я час (Фигура 8А,С). Процесът се характеризираше с висока възпроизводимост. Бавната скорост на растежа позволяваше изолирането на 8-9 фракции от една реакционна система (Фигура 8В), различаващи се по размера и емисионния максимум. Всяка една фракция се характеризираше с хомогенен размер на частиците с отклонение от средния диаметър <5%. Прозрачността на суспензиите е индикация за висока колоидна стабилност на наночастиците и отсъствие на агрегация при диспергирането им в хлороформ. Тази степен на прозрачност се запазваше в течение на дълъг период от време (над година) при съхраняване на тъмно, на стайна температура.



**Figure 8.** (A) Kinetic curve of crystal growth at slow-increasing temperature gradient (Cd:Se = 1:1). The aliquots were isolated at 110 °C, 150 °C, 190 °C, 220 °C, and 250 °C, respectively (from left to right). The stopping at the desired moment allows an isolation of fraction with desired size. The data are mean $\pm$ SD from 3 different experiments. QD size was calculated from the subsequent absorption spectra of each fraction, using the equation of Yu et al. (2003). (B) Eight CdSe QD fractions with different averaged size (color), isolated simultaneously from one reaction mixture. QDs were dissolved in chloroform. Representative image from one experiment is shown in the figure. (C) HRTEM image of population of CdSe nanocrystals, isolated at the time-point, mentioned with dotted line in (A) (300 min after starting the reaction). The averaged diameter of CdSe nanocrystals was 3.5 nm.

На **Фигура 9** са представени абсорбционните и емисионните спектри на шест фракции CdSe, изолирани едновременно от една реакционна система в условията на бавнонарастващ температурен градиент. Всички QD-фракции се характеризират с ясноочертан първи пик на екситона в абсорбционните спектри и тесни, дискретни емисионни спектри. Средният диаметър на наночастиците в 6-те фракции, изчислен на базата на абсорбционните спектри, е съответно: 2.14, 2.41, 2.66, 3.00, 3.82 и 4.37 nm. FWHM на първия пик на екситона в абсорбционния спектър варира от 18 до 55 nm, което съответства на отклонения от средния размер в границите

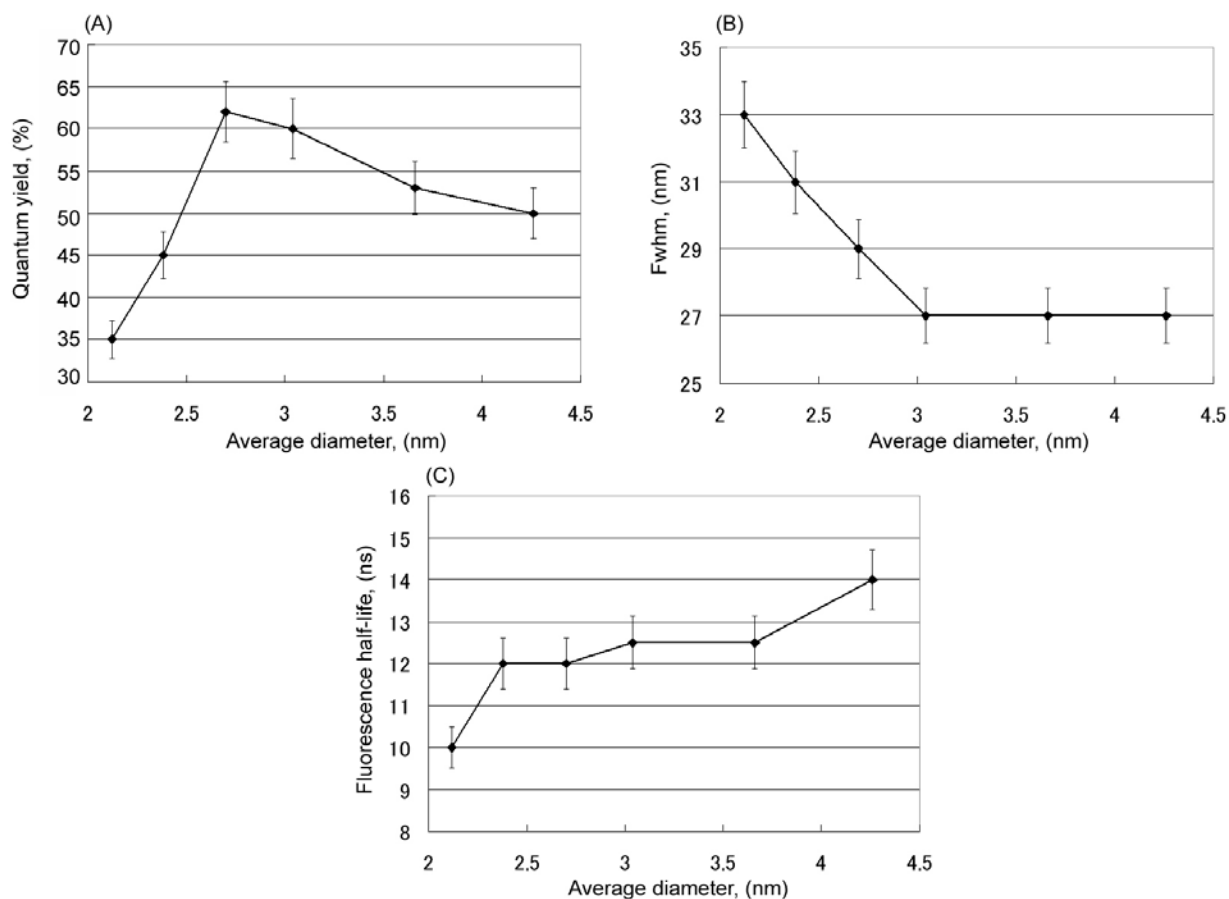
на 2.0-5.5%. Хомогенността на размера във всяка една фракция беше потвърдена и чрез HRTEM.



**Figure 9.** (A1, B1) Normalized absorbance and emission spectra of six size-homogeneous CdSe QD fractions, isolated simultaneously from one-pot in slow-increasing temperature gradient ( $\lambda_{\text{ex}} = 420$  nm). Representative data from one experimental protocol are shown in the figure. (A2, B2) Images of CdSe QD fractions on a visible light and under UV irradiation. Representative images from one experiment are shown in the figure.

Фотофизичните свойства на шест от изолираните едновременно QD-фракции в 3 независими една от друга процедури са дадени на **Фигура 10**. Фракциите се характеризират с висок квантов добив – 35-62% (Фигура 10A), фокусирана флуоресцентна емисия – FWHM  $\sim$ 27-33 nm (Фигура 10B), време на полуживот на флуоресценцията във възбудено състояние – 10-14 ns, характерно за краткоживущата „band-edge” флуоресценция (Фигура 10C). Стоксовото отместване между първия пик на екситона в абсорбционния спектър и емисионния максимум варира от 18 до 33 nm, в зависимост от размера на наночастиците във всяка една фракция. Всички фотофизични характеристики са измерени в органичен разтворител (хлороформ) без пост-препаративни третираня и пасивиране на повърхността на кристалните ядра от CdSe.





**Figure 10.** Fluorescence quantum yield (A), full-width at half-maximum of fluorescent spectra (B), and fluorescence life-time (C) of six size-homogeneous CdSe QD fractions, isolated simultaneously in slow-increasing temperature gradient. The data are mean $\pm$ SD from 3 independent experiments. The fractions were isolated at the same time-intervals from the beginning of the reaction. All fractions were dissolved in chloroform.

При повърхностно пасивиране на нанокристалите CdSe с няколко монослоя от неорганичен шел (ZnS), квантовият добив нарастваше от 35-60% на 42-72% в органичен разтворител. Нанокристалите CdSe/ZnS се характеризираха с висока колоидна стабилност в органичен разтворител (хлороформ, хексан, толуен) на стайна температура. Прехвърлянето на наночастиците CdSe/ZnS от органична във водна фаза чрез директна замяна на хидрофобните координационни лиганди с амфифилни/хидрофилни водеше до намаляване на квантовия добив до 14-20% във воден разтвор, както и в буферни разтвори с рН  $\sim$ 7.2-7.5. Този начин за модифициране на повърхността на QD CdSe/ZnS, с цел диспергирането им във водна среда, не водеше до промяна на профила на абсорбционните и емисионните им спектри. Водоразтворимите наночастици се характеризираха със сравнително добра колоидна стабилност при съхраняване на 4-8 °C. Наблюдаваше се известна агрегация при прехвърлянето на наночастиците от органична във водна фаза, което налагаше допълнителна обработка на фракциите с цел отстраняване на агрегатите чрез спин-ултрафилтрация.

Трябва да се отбележи, че директното прехвърляне на неупаковани с ZnS-шел нанокристали CdSe от органична във водна фаза водеше до почти пълна загуба на флуоресценцията – квантовият добив на неупакованите вододиспергируеми QD CdSe беше под 0.5%. Общоприето е схващането, че пасивирането на повърхността на нанокристалите CdSe с материал с по-голяма ширина на забранената енергетична зона, каквато

е ZnS, води до елиминиране (или свеждане до минимум) на нерадиационните релаксационни процеси, конкуриращи флуоресценцията и предотвратяване на фотохимичното разграждане на кристалното ядро [Rogach, 2007]. Дори един-два монослоя от ZnS (с дебелина  $\sim 0.6$  nm) са достатъчни, за да намалят процесите на окисление на ядрото, протичащи в полярни разтворители, каквито са всички физиологични и телесни течности. Grabolle et al. (2008) показват, че ZnS-шел от 2-3 монослоя (с дебелина  $\sim 0.6-0.9$  nm) е оптимален за висока стабилност и висок квантов добив на наночастици CdSe/ZnS в органичен разтворител. В нашата експериментална практика, обаче, установихме, че ZnS-шел с по-голяма дебелина (4-5 монослоя,  $\sim 1.2-1.5$  nm) обезпечава значително по-висок флуоресцентен квантов добив на наночастиците CdSe/ZnS във водна среда.

\* \* \*

В заключение, описаният по-горе оригинален метод за получаване на QD CdSe в условия на бавнонарастващ температурен градиент се характеризира със следните предимства:

- Висока възпроизводимост на процеса.
- Синхронно изолиране на няколко хомогенни по размер фракции от една реакционна система.
- Прецизен контрол на растежа на наночастиците и възможност за изолиране на фракции с желани размери и фотофизични свойства.
- Висока хомогенност на размера.
- Пълно изчерпване на прекурсорите, гарантиращо висока безопасност по отношение на околната среда.

Методът е защитен с японски патент. Детайлите са публикувани през 2007 в *Inorganic Chemistry*. Статията беше селектирана като "Most accessed article for the third quarter of 2007" на списанието.

Изолираните QD-фракции се характеризираха с хомогенен размер на наночастиците (отклонение от средния диаметър  $<5\%$ ), висок квантов добив ( $\sim 35-62\%$ ), фокусирана („band-edge“) флуоресцентна емисия (FWHM  $\sim 27-33$  nm) и висока колоидна стабилност в органичен разтворител. Пост-препаративното пасивиране на повърхността на наночастиците с неорганичен шел от ZnS водеше до повишаване на квантовия добив до 42-72% в органичен разтворител. Водоразтворимите QD CdSe/ZnS, получени чрез замяна на хидрофобните координационни лиганди с хидрофилни, се характеризираха с квантов добив 14-20%, фокусирана („band-edge“) флуоресцентна емисия и висока колоидна стабилност. Наличието на 6 и повече фракции с различен размер, респ. различни максимуми на емисия, позволяваше използването им за разработване на мултиплексни флуоресцентни анализи. Известен недостатък на описаните по-горе водоразтворими QD беше сравнително ниският квантов добив – съизмерим с този на органичните флуорофори. Това правеше наночастиците подходящи за приложение в биоанализи с флуоресцентна детекция *in vitro*, но не и за флуоресцентен имиджинг *in vivo*. С цел повишаване на квантовия добив и колоидната стабилност на водоразтворимите QD CdSe/ZnS във високосолеви разтвори, беше разработена специална стратегия за тяхното допълнително опаковане, която ще бъде разгледана в раздел II на *Експериментални резултати*. Тази стратегия позволяваше получаването на водоразтворими QD CdSe/ZnS с „band-edge“ флуоресценция и квантов добив  $\sim 50\%$ , подходящи за разработване на QD-проби за високочувствителни мултиплексни биоанализи с флуоресцентна детекция, както и за мултимодални имиджинг анализи *in vivo*.

## II. Разработване на оригинална стратегия за получаване на високофлуоресцентни водоразтворими наночастици CdSe/ZnS с „band-edge” емисия, подходящи за мултиплексни и мултимодални имиджинг анализи

### 1. „Единични QD-мицели”, капсулирани в силика-шел – структура и фотофизични свойства

В началото на настоящото десетилетие беше общоприето схващането, че опаковането на наночастиците CdSe/ZnS с допълнителни органични/неорганични обвивки би довело до запазване на квантовия им добив във водна среда на нивото, регистрирано в органичен разтворител (~40-70%) или малко под това ниво. С оглед на нуждите на биоимиджинга, материалите за опаковане на наночастиците трябваше да бъдат максимално инертни и биопоносими и да обезпечават ефективно изолиране на кристалното ядро от околната среда. Всяка допълнителна обвивка, обаче, водеше до повишаване на общия размер на наночастиците, което криеше риск от появата на ефекти на опсонизация и индукция на имунен отговор при въвеждането им в живия организъм.

Едни от най-подходящите кандидати за опаковане на QD бяха инертните и биопоносими силика-материали, които са с доказано приложение в биомедицинската практика. Тези материали позволяват да се формира обвивка с различна дебелина върху повърхността на кристалното ядро – от 4-5 nm до 200-300 nm и дори микрометри, обезпечават добра водоразтворимост на QD и функционализиране на повърхността на наночастиците с оглед на конюгирането им с органични и/или биоорганични лиганди [Bruches et al., 1998; Gerion et al., 2001; Nann & Mulvaney, 2004; Yi et al., 2005]. Порестият характер на силика-шела, обаче, създаваше редица затруднения, свързани със значителното редуциране на квантовия добив, поради проникваемостта на обвивката за малки молекули и йони (като тези на водата и кислорода), взаимодействащи с атомите от повърхността на кристалното ядро и повишаващи дела на нерадиоационните преходи. Това е един от най-съществените фактори, обуславящи сравнително ниския квантов добив на капсулираните в силика-шел QD CdSe/ZnS, описани в литературата до 2006-та година: <20% при размери на силика-сферите около или по-малки от 50 nm в диаметър. За да се обезпечи висок квантов добив, дебелината на силика-шела трябваше да бъде над 150-200 nm в диаметър, което от своя страна правеше наночастиците големи и неподходящи за биоанализи, поради риска от индукция на имунни ефекти в живите организми [Choi et al., 2007; Cho et al., 2009; Waters et al., 2009]. Капсулираните в силика-шел QD се характеризираха със сравнително ниска колоидна стабилност във високосолеви разтвори и нехомоген (разнороден) състав.

Ранните подходи за разработване на QD CdSe/ZnS, опаковани в силика-шел, изхождат от директен синтез на наночастиците в водна фаза или микроемулсии от хидрофилна/хидрофобна фаза („water-to-oil”)[Chang et al., 1994; Liz-Marzan et al., 1996; Bruchez et al., 1998; Correa-Duarte et al., 1998; Ung et al., 1998; Mulvaney et al., 2000; Rogach et al., 2000; Farmer & Patten, 2001; Wang & Asher, 2001; Yang & Holloway, 2004; Santra et al., 2005]. Тези стратегии, обаче, водят до получаване на нискофлуоресцентни водоразтворими QD (с квантов добив под 10%) и често са съпътствани от силно дефокусиране на размера и флуоресцентната емисия. Във всички, описани по-горе работи, силика-наночастиците са хетерогенни по размер и форма, с различен и недефиниран брой QD в обема на силика-сферите. Това затруднява и дори прави невъзможно тяхното дозиране (прецизното калкулиране на тяхната тегловна или моларна концентрация), което е задължително условие при биоанализите.

Gerion et al. (2001) и Nann & Mulvaney (2004) описват за първи път капсулирани в силика-шел QD, състоящи

се предимно от една квантова точка в една силика-сфера. Това дава възможност за нормиране на концентрацията на наночастици на базата на екстинкционния коефициент на QD. Описаните наночастици са хомогенни по размер и форма, но се характеризират със сравнително нисък квантов добив във водна среда (5-14%). Ниският квантов добив би могъл да се отдаде на два фактора: (i) на замяната на хидрофобните координационни лиганди с хидрофилни преди добавянето на първия силика-прекурсор и инициирането на полимеризацията; и (ii) на финият силика-шел на наночастиците, описани от [Gerion et al. \(2001\)](#), който обезпечава малкия им размер (~10 nm в диаметър), но не обезпечава сигурна защита на повърхността на кристалното ядро от полярния разтворител.

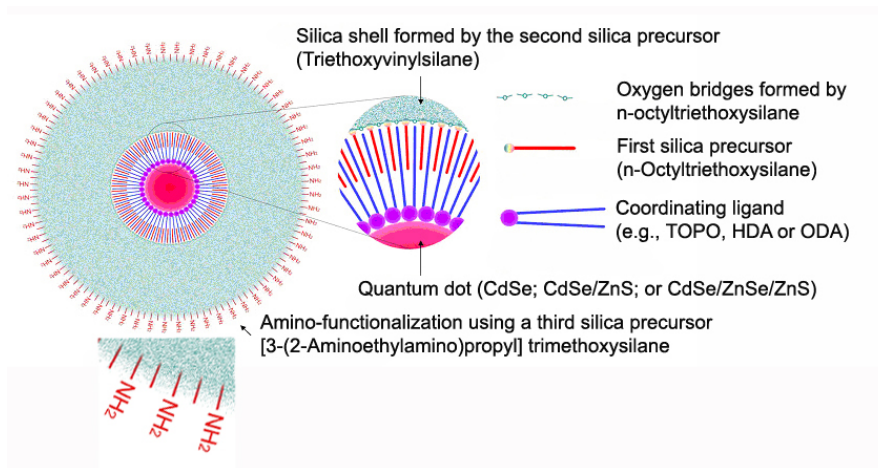
[Yi et al. \(2005\)](#) и [Kim et al. \(2006\)](#) избягват предварителната замяна на хидрофобните лиганди като използват сърфактант-опосредствана микроемулсионна техника при капсулирането на QD в силика. Получените наночастици, обаче, са съставени от няколко или десетки QD в една силика-сфера. Големината на силика-частиците варира от 30 до 150 nm в диаметър. Максималният им квантов добив във водна среда е 14.6% – от 6 до 8 пъти по-нисък от регистрирания в органичен разтворител (~85%). Включването на една квантова точка в една силика-сфера, без предварителна замяна на хидрофобните лиганди и с използване на сърфактант-опосредствана микроемулсионна техника, е описано от [Darbandi et al. \(2005\)](#). Авторите, обаче, посочват, че хидрофобните лиганди се изместват от силика-прекурсорите в хода на полимеризацията и се извеждат от системата. В работата не се посочват данни за фотофизичните и физикохимичните характеристики на тези наночастици (квантов добив, хомогенност на размера, колоидна стабилност във воден разтвор), което е изключително важно в контекста на тяхното потенциално приложение за флуоресцентни биоанализи.

През 2006-та година, нашият колектив разработи оригинална стратегия за получаване на високофлуоресцентни, капсулирани в силика-шел „единични квантови точки” CdSe/ZnS (с квантов добив ~30-40%), характеризиращи се с малък хомогенен размер (~15-20 nm в диаметър; отклонение от средния диаметър ~12%), фокусирана флуоресцентна емисия и висока колоидна стабилност в дестилирана вода. Стратегията беше базирана на предположението, че предварителното опаковане на кристалното ядро в хидрофобен мицел и последващото капсулиране на мицела в силика-шел би довело до по-добра изолация и защита на повърхността на кристала от полярния разтворител. Това, от своя страна, би свело до минимум нерадиационните преходи в кристалното ядро и би запазило квантовия добив на водоразтворимите, капсулирани в силика-шел QD максимално близък до този в органичен разтворител. Разработената от нас стратегия се базираше на данните от няколко предварителни изследвания, публикувани от чужди автори, третиращи включването на неорганични наночастици в мицели от сърфактант/липид, фосфолипид/блок-кополимер [[Dubertret et al., 2002](#); [Fan et al., 2005](#)] или силика-прекурсори [[Chen & Rosenzweig, 2002](#)]. Подходът включваше няколко етапа и водеше до получаване на стабилни „единични лиганд-координирани QD-мицели”, капсулирани в силика-шел.

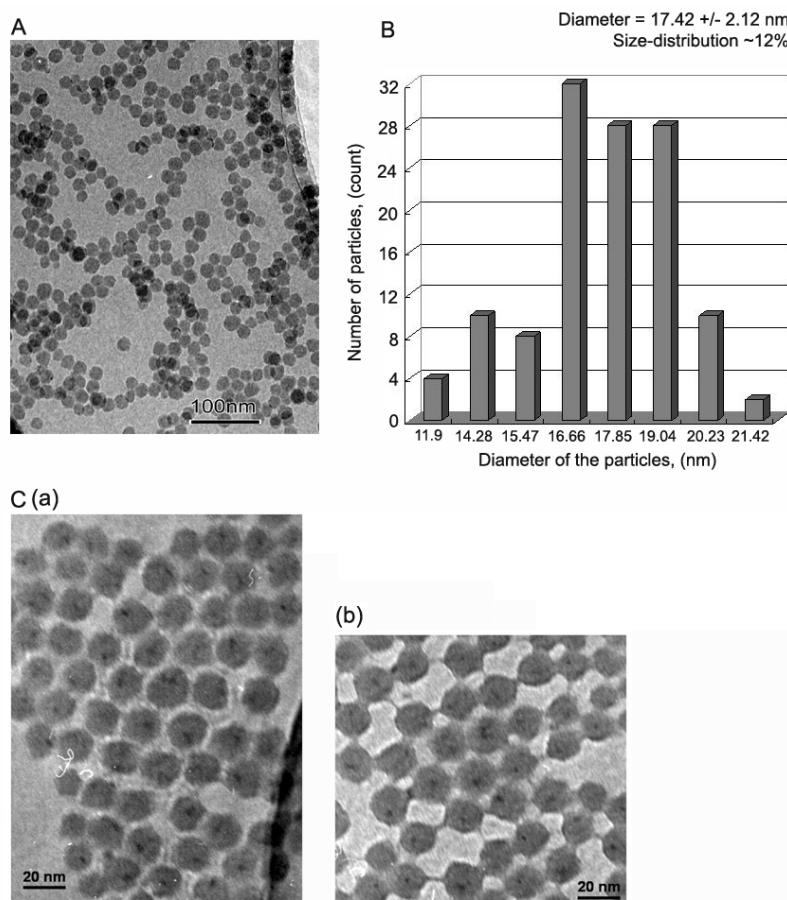
Моделната структура на капсулираните в силика-шел QD е показана на **Схема 1**. Всяка една наночастица е изградена от: (i) единична QD; (ii) хидрофобен мицел около QD, формиран от молекулите на координационните лиганди и първия (хидрофобен) силика-прекурсор; (iii) кислородни мостове, формирани в резултат на краткотрайна полимеризация на първия силика-прекурсор върху повърхността на мицела; (iv) силика-шел, формиран в резултат на полимеризация на втория (амфифилен) силика-прекурсор; (v) функционализиране на повърхността на силика-сферите с amino-групи чрез краткотрайна полимеризация на трети (хидрофилен)

силика-прекурсор върху силика-шела.

Резултатите от трансмисионната електронна микроскопия показаха, че капсулираните в силика-шел „единични QD-мицели” са сферични по форма (Фигура 11А), със среден диаметър  $17.42 \pm 2.12$  nm и сравнително ниска полидисперсност на размера (~12% отклонение от средния размер)(Фигура 11В). Основната част от популацията (~92%) се състоеше от наночастици, изградени от една QD, включена в състава на една силика-сфера (Фигура 11С). Около 6% от наночастиците в популацията съдържаха по две QD в една силика-сфера, а ~2% от силика-сферите не съдържаха QD.



**Scheme 1.** A model structure of silica-shelled single QD micelles [according to [Bakalova et al., 2006](#)].



**Figure 11.** A representative TEM image of a large population of silica-shelled single CdSe/ZnS QD micelles (A) and size histogram

of this population (B). (C) TEM images of the same population at large magnification. Inside the silica spheres, there are dark spots, indicating QD nanocrystals. The major part of silica spheres contains single QD. Few silica particles contain two QDs inside. TEM images are from two independent experiments, using different QDs: (a) CdSe/ZnS, ~3.1 nm in diameter; silica spheres, 17.42 +/- 2.12 nm in diameter; size distribution ~12%; (b) CdSe, ~2.1 nm in diameter; silica spheres, 17.19 +/- 1.93 nm in diameter; size distribution ~11.2%.

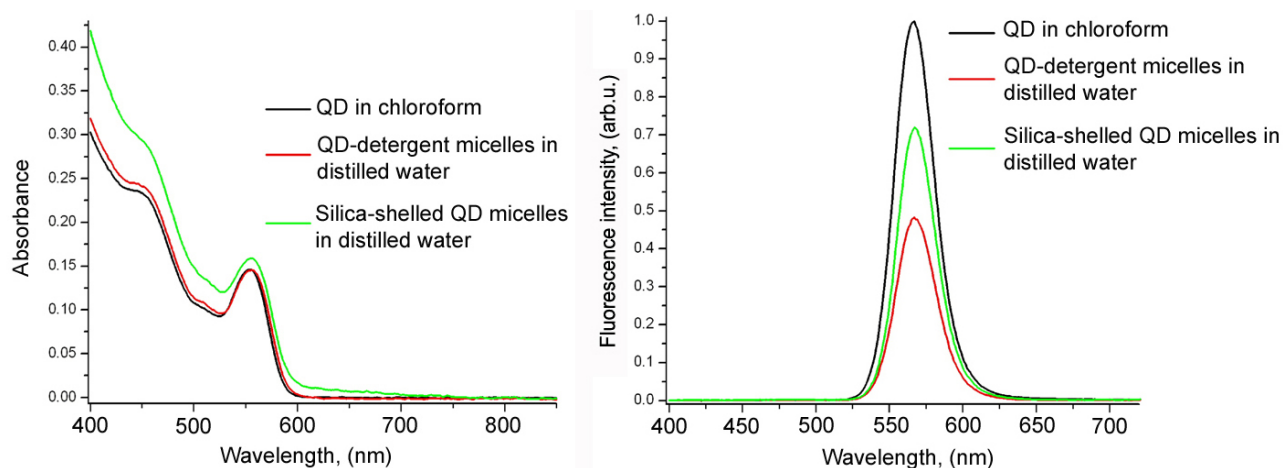
Измерването на  $\zeta$ -потенциала доказваше наличието на положително-заредена (катионна) повърхност на наночастиците. При ниски стойности на рН (3.0),  $\zeta$ -потенциалът на amino-функционализираните наночастици беше средно +28 (+/- 4.0) mV, като намаляваше до -31 (+/-3.8) mV при алкално рН (10.0). При физиологични стойности на рН (7.4), средната стойност на  $\zeta$ -потенциала на тези наночастици беше +6.5 mV.

Какви са предимствата и недостатъците на описаната по-горе структура на капсулираните в силика-шел QD?

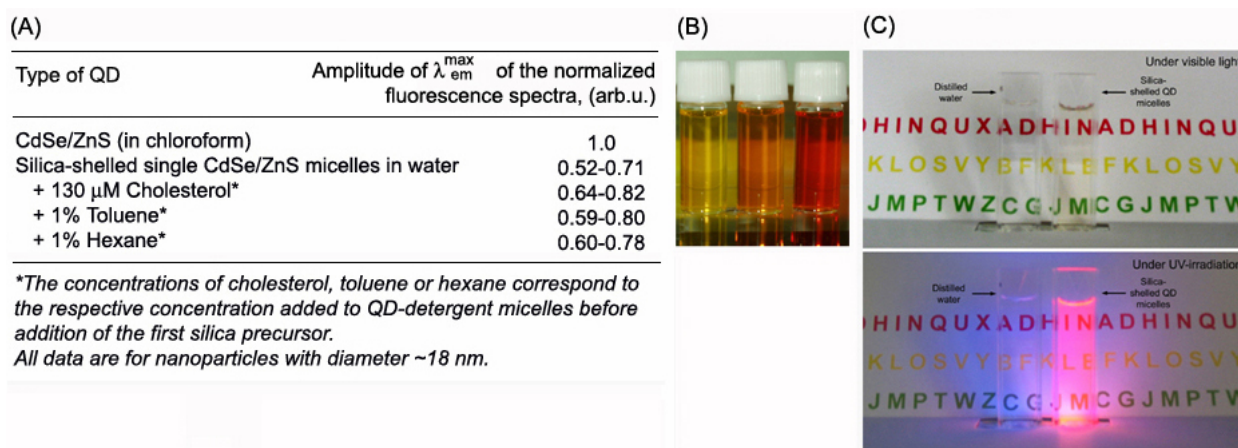
Основно предимство на получените наночастици е наличието на хидрофобен слой между QD и силика-шела, който предпазва повърхността на кристалното ядро от съприкосновение с малките молекули и йони на полярния разтворител. Това, вероятно, е и основният фактор за сравнително високия интензитет на флуоресценция на капсулираните в силика „единични QD-мицели”, който в дестилирана вода беше едва с ~30% по-нисък от този в органичен разтворител (**Фигура 12**). Най-високият квантов добив на водоразтворимите, капсулирани в силика-шел QD-мицели (44%) беше регистриран при използване на нанокристали CdSe/ZnS с квантов добив в хлороформ ~70% (**Фигура 13A**). Дебелината на ZnS-шела беше от съществено значение за запазване на високия квантов добив на капсулираните в силика-шел QD CdSe/ZnS. Квантовият добив на опакованите в силика-шел CdSe QD-мицели беше ~3 пъти по-нисък от този на същите QD CdSe в органичен разтворител.

Силика-шелът не променяше профила на абсорбционния и емисионния спектри. Наблюдаваше се слабо дефокусиране на първия пик на екситона и повдигане на абсорбционния спектър, най-вероятно поради повишаване на разсейването на светлината от значително по-големите по размер силика-сфери (превишаващи критичния размер от 12 nm). FWHM се запазваше тесен (~30 nm) (**Фигура 12**). Предварителното включване на други хидрофобни молекули (холестерол, толуен, хексан) в структурата на мицела повишаваше интензитета на флуоресценцията с около 10% (**Фигура 13A**).

Водният разтвор на капсулираните в силика-шел QD-мицели се характеризираше с висока прозрачност (**Фигура 13B**), което е индикация за отсъствие на агрегация на наночастиците. Пикомоларни концентрации от разтвора (които са абсолютно прозрачни на видима светлина) се характеризираха с изключително ярка флуоресценция при възбуждане с UV-светлина (**Фигура 13C**).



**Figure 12.** Representative absorbance and emission spectra of CdSe/ZnS QD in chloroform, QD/detergent micelles in distilled water and silica-shelled single QD micelles in distilled water.



**Figure 13.** (A) Amplitudes of normalized fluorescence spectra of silica-shelled single CdSe/ZnS QD micelles in distilled water with and without additional hydrophobic molecules incorporated into the micelle part. The results are mean from 3 to 5 independent experimental protocols. (B) Image of three different colours of silica-shelled CdSe/ZnS QD micelles in PBS. (C) Images of silica-shelled CdSe/ZnS micelles (100 pM QD concentration) in distilled water under visible light and UV irradiation (7 kW). For comparison, a sample containing distilled water is shown in the figure (left part).

Капсулирането на една квантова точка в една силика-сфера, както и запазването на профила на абсорбционния спектър дават възможност да се нормира концентрацията на силика-наночастиците, на базата на моларната концентрация на QD, изчислена по метода на Yu et al. (2003). Независимо че нормирането е приблизително, то осигурява възможност за дозиране на флуоресцентната проба и прилагането ѝ за сравнителни имиджинг анализи на биологични обекти. Прецизното дефиниране на концентрацията на наночастиците е от изключителна важност за изследване на тяхната токсичност, фармакодинамика и фармакокинетика *in vivo*.

Малките размери на силика-сферите (под 20 nm в диаметър) е от съществено значение за използването на описаните по-горе QD за *in vivo* имиджинг анализи при минимален риск от опсонизация и имунни ефекти. Това бяха първите малки, капсулирани в силика-шел QD с квантов добив над 30%, описани в литературата до 2006-та година.

Недостатък на капсулираните в силика-шел QD-мицели беше сравнително ниската им колоидна стабилност във високосолеви разтвори. Суспензиите от аминок-функционализирани наночастици бяха стабилни в дестилирана вода и 20 mM Tris-HCl буфер (pH 6.5-7.3). Във високосолеви фосфатни и карбонатни буфери (100-150 mM), при физиологични стойности на pH (7.2-7.5), обаче, силика-наночастиците агрегираха и квантовият им добив намаляваше съществено. Това налагаше допълнително модифициране на повърхността на силика-сферите с органични и/или биоорганични лиганди, които да повишат колоидната стабилност на наночастиците във физиологични разтвори. Един от най-добрите кандидати беше полиетилегликолът. При конюгиране на повърхността на силика-сферите с PEG се наблюдаваше значително повишаване на колоидната стабилност на наночастиците във високосолеви физиологични разтвори и телесни течности и запазване на високия им квантов добив.

\* \* \*

В заключение, описаната по-горе оригинална стратегия за капсулиране на QD CdSe/ZnS в силика-шел, със запазване на хидрофобните координационни лиганди около кристалното ядро, водеше до получаване на високофлуоресцентни водоразтворими наночастици. Популацията съдържаше предимно една QD, включена в състава на една силика-сфера. Наночастиците бяха със сравнително малък и хомогенен размер (<20 nm в диаметър, с отклонение от средния размер ~12%), фокусирани абсорбционен и емисионен спектри, висок квантов добив във воден разтвор (~30-40%), висока колоидна стабилност в дестилирана вода. Лесното функционализиране на повърхността на силика-сферите ги правеше подходящи за конюгация с органични и биоорганични лиганди. Конюгирането на наночастиците с PEG водеше до значително повишаване на колоидната им стабилност в ниско- и високосолеви физиологични разтвори, което ги правеше подходящи не само за *in vitro*, но и за *in vivo* имиджинг анализи.

Капсулираните в силика-шел „единични QD-мицели”, както и методът за тяхното получаване, са защитени с японски патент. Резултатите са публикувани през 2006-та година в *J. Am. Chem. Soc.* и *Anal. Chem.* [Zhelev et al., 2006b; Bakalova et al., 2006]. Отзив за работата е публикуван в брой 2 на *BioPhotonics International* (2006).

## **2. Разработване на мултимодални QD-проби на базата на капсулирани в силика-шел „единични QD-мицели”**

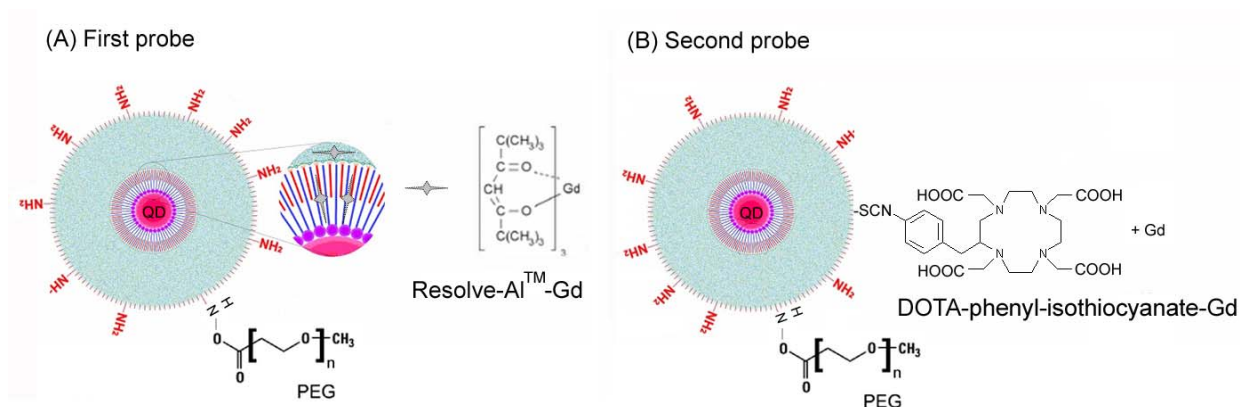
Наличието на хидрофобен слой между QD и силика-шела позволява включването на други хидрофобни молекули в състава на силика-сферите (напр., липофилни антиоксиданти, фотосенсибилизатори, парамагнитни липидни субстанции...). От друга страна, в силика-шела биха могли да се включат различни амфибилни молекули или други наночастици с амфибилен характер (като феромагнитни наночастици, хелатори за парамагнитни йони и радионуклиди). Това би придало втора модалност на наночастиците (в допълнение към техните флуоресцентни свойства), което прави опакованите в силика-шел QD подходяща матрица за разработването на бимодални и мултимодални проби за имиджинг диагностика и фотосенсибилизация. В този контекст, описаната в предишния раздел стратегия позволява комбинирането на мултимодалните характеристики на хибридният материал с мултифункционалността на QD-пробата и предимствата на малките й размери.

Публикуваните до 2006-та година стратегии за разработване на мултимодални проби (с техните предимства и недостатъци) са обобщени в *Nature Photonics* [Bakalova et al., 2007b]. По-долу са описани структурата и



физико-химичните характеристики на разработените от нас мултимодални QD-проби, комбиниращи флуоресцентни и парамагнитни свойства – подходящи за флуоресцентен имиджинг и MRI. Комбинирането на тези две модалности за образна диагностика е изключително перспективен подход, тъй като MRI (с високата си резолюция) дава много добра анатомична картина и възможност за проследяване на пътя на пробата в организма (напр., локализирането и в дадена тъкан, орган...), докато флуоресцентният имиджинг (с високата си чувствителност) дава детайлна информация за локализацията и състоянието на пробата на субклетъчно ниво.

**Схема 2** представя моделната структура на две мултимодални QD-проби, разработени от нашия колектив. Първата проба (проба А) се състоеше от капсулирана в силика-шел QD и хелатор за парамагнитни йони (Resolve-Al<sup>TM</sup>/Gd), включен в състава на хидрофобния мицел и/или силика-шела (Схема 2А). Втората проба (проба В) се състоеше от капсулирана в силика-шел QD и хелатор за парамагнитни йони (DOTA-phenyl-isothiocyanate/Gd), конюгиран на повърхността на силика-наночастицата (Схема 2В). Проба В е класически вариант на мултимодална проба, разработен и от други автори, докато проба А е оригинален вариант, разработен и описан за първи път от нашия колектив [Bakalova et al., 2008].



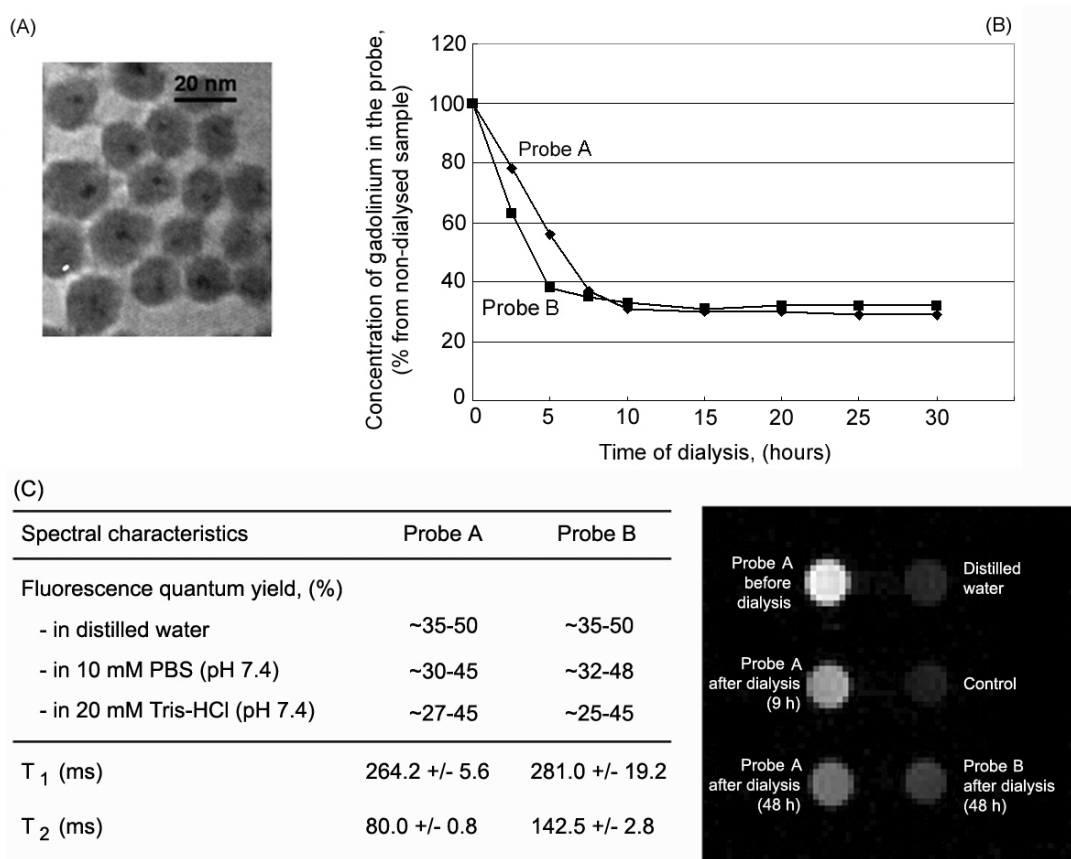
**Scheme 2.** Structures of multimodal silica-shelled QD probes. In the first structure (A), the gadolinium chelator is incorporated into the silica coat and/or hydrophobic micelle around QD. In the second structure (B), the gadolinium chelator is conjugated on the surface of silica sphere.

При проба А, мицеларната структура около QD позволява включването на хидрофобни парамагнитни субстанции в силика-сферите (като <sup>19</sup>F- или <sup>14</sup>C-белязани мастни киселини, хидрофобни комплекси на Gd- или Mn-йони – едни от най-често използваните парамагнитни субстанции в образната диагностика). Слабо хидрофобни (до амфибилни) парамагнитни субстанции могат да бъдат включени и в силика-шела. И в двата случая, парамагнитните субстанции са достъпни за малките водни молекули, които могат да проникват през порестата структура на силиката. Съприкосновението с водните молекули е задължително условие за <sup>1</sup>H-MRI контрастните агенти, каквито са Gd- и Mn-йони. Хидрофобният мицел, от друга страна, изолира QD от малките молекули на полярния разтворител и така предпазва кристалното ядро от окисление и запазва флуоресцентния квантов добив.

Повърхността и на двете проби беше amino-функционализирана и готова за конюгиране с биологично-активни лиганди и PEG, с оглед на повишаване времето им на живот в кръвообръщението. Структурата на проба А осигуряваше по-голяма мобилност при конюгирането на лиганди на повърхността на

силика-наночастиците, докато при проба В беше необходимо да се балансира съотношението хелатор/лиганд така, че да се получи максимално висок MRI контраст (идващ от броя на молекулите на хелатора и комплексирани Gd-йони) и достатъчно висока специфичност и афинитет на пробата към биологичния таргет (идващи от броя и пространствената ориентация на молекулите на таргет-специфичния лиганд).

Популацията от наночастици и при двете проби се състоеше от силика-сфери със среден диаметър  $18.1 \pm 1.4$  nm, с включена в тях една квантова точка (Фигура 14А), което позволяваше изчисляване на приблизителната им концентрация в молове.



**Figure 14.** (A) Transmission electron micrographs of multimodal silica-shelled QDs. (B) Retention of gadolinium complex in the silica sphere (probe A) or on the surface of the silica sphere (probe B) after purification by dialysis. (C) Fluorescence and paramagnetic characteristics of probes A and B. The probes were purified using 48 h dialysis. Longitudinal relaxation time ( $T_1$ ) and transverse relaxation time ( $T_2$ ) were calculated at equal concentrations of both probes (normalized to the QD concentration 500 nM). The QD concentration was calculated from the absorbance spectra of multimodal silica-shelled QDs, using the equation of Yu et al. (2003). The MRI measurements were performed in a 4.7 T magnet (General Electric, CT) interfaced to a Bruker Avance console (Bruker Medical GmbH, Germany). A 30 mm diameter Litz coil (Doty Scientific Inc., SC, USA) was used for measurement of the samples. The sample temperature was maintained at room temperature ( $\sim 22$ - $24$  °C). The measurements were performed in the following order:  $T_1$ -weighted imaging using conventional spin-echo (SE) sequence; multiecho SE imaging for  $T_2$  calculations; and inversion-recovery SE imaging for  $T_1$  calculations. For calculation of fluorescence quantum yield, the spectrally integrated emission of particle dispersion in different aqueous solutions was compared with the integrated emission of an ethanol solution of rhodamine G (Fluka) of identical optical density ( $<0.015$ ) at the excitation wavelength 365 nm.

На Фигура 14В се вижда, че в хода на пречистването на пробите чрез диализа концентрацията на гадолиниевия комплекс намалява до около 10-я час, след което се задържа постоянна. Този резултат показва също, че ~25% от изходната концентрация на гадолиниевия комплекс се задържат във или върху силика-наночастиците.

Някои автори са показали, че непосредствената близост на QD с парамагнитни или феромагнитни субстанции води до понижаване на флуоресцентните и пара-/феромагнитните свойства на хибридният материал в сравнение със свойствата на изолираните един от друг материали [Cozzoli et al., 2006; Selvan et al., 2007]. Двете бимодалните проби, описани по-горе, представят два гранични варианта. При проба А QD и гадолиниевият комплекс са в непосредствена близост, а при проба В двете контрастни субстанции са отдалечени една от друга на достатъчно голямо разстояние. Сравнителният анализ на спектралните характеристики на двете проби показва, че дистанцията между QD и гадолиниевия комплекс не повлиява флуоресцентния квантов добив, както и  $T_1$  и  $T_2$  времената на релаксация на пробите (Фигура 14С). Флуоресцентният квантов добив варираше от 25 до 50%, в зависимост от големината на QD, включени в състава на силика-сферите, както и от вида на разтворителя (дестилирана вода, Tris-HCl или фосфатен буфер). Този квантов добив беше с ~40% по-нисък от изходния квантов добив на QD в органичен разтворител, но идентичен с квантовия добив на капсулирани в силика-шел QD в отсъствие на гадолиниев комплекс. И двете проби се характеризираха със сравнително високи и приблизително еднакви времена на релаксация  $T_1$  и  $T_2$ , независимо дали гадолиниевият комплекс е включен в структурата на силика-шела или е конюгиран на повърхността на силика-частиците. Това е доказателство, че близкото разстояние между QD и гадолиниевите йони в проба А не повлиява отрицателно парамагнитните свойства, което би могло да се обясни с добрата изолация на Gd от кристалното ядро посредством хидрофобния мицел. След пречистването, стойностите за  $T_1$  и  $T_2$  на проба А бяха малко по-ниски от тези за проба В (Фигура 14С). Разликата може да се отдаде на различния брой молекули на хелатора, включени трайно в структурата на двете проби. Съотношението Gd/QD беше изчислено на ~18:1 (mol:mol) при проба А и на ~17.6:1 (mol:mol) при проба В.

С цел повишаване на колоидната стабилност на наночастиците във високосолеви разтвори и тяхното приложение за мултимодална имиджинг диагностика *in vivo*, двете структури бяха допълнително конюгирани с PEG.

\* \* \*

В заключение, представените по-горе експериментални данни са пряко доказателство, че капсулираните в силика-шел QD-мицели са подходяща матрица за разработване на мултимодални проби за имиджинг анализи. Разработените от нас мултимодални проби се характеризираха с висок флуоресцентен квантов добив (>30%) и достатъчно висока  $T_1$  и  $T_2$  релаксивност ( $T_1 = 264.2 \pm 5.6$  ms за проба А и  $T_1 = 281.0 \pm 19.2$  ms за проба В;  $T_2 = 80.0 \pm 0.8$  ms за проба А и  $T_2 = 142.5 \pm 2.8$  ms за проба В). Тези две характеристики ги правеха приложими едновременно за флуоресцентна и MR имиджинг диагностика. Амино-функционализираните проби се характеризираха с висока колоидна стабилност във воден разтвор и нискосолеви буферни разтвори. Конюгирането на наночастиците с PEG и биолиганди (малки пептиди или фрагменти от антитела) повишаваше колоидната им стабилност във високосолеви разтвори и телесни течности.

### III. Приложение на таргет-специфични QD-проби за биомедицински анализи с флуоресцентна детекция *in vitro*

#### 1. Разработване на флуоресцентни анализи за разпознаване на левкемични клетки от нормални лимфоцити на базата на взаимодействието рецептор-лиганд с използване на конюгати QD-лектин

Структурата на вододиспергируемите QD позволява сравнително лесно модифициране на тяхната повърхност с биоорганични лиганди, без да се понижава флуоресцентният квантов добив [Medintz et al., 2005]. Това утвърди с времето QD като предпочитана алтернатива на конвенционалните органични флуорофори при разработването на високофлуоресцентни проби за *in vitro* анализи на биологични обекти с използване на флуоресцентна микроскопия и флоуцитометрия [Hanaki et al., 2003; Jaiswal et al., 2003; Kaul et al., 2003; Wu et al., 2003; Lidke et al., 2004; Sukhanova et al., 2004; Clapp et al., 2006; Hild et al., 2008; Ibanez-Peral et al., 2008].

На базата на високофлуоресцентна хибридна проба QD-лектин, подходяща за имуноцитохимични анализи *in vitro* и гарантираща висока чувствителност на флуоресцентните измервания, разработихме високочувствителен и удобен за работа флуоресцентен метод за разпознаване на левкемични клетки от нормални лимфоцити [Zhelev et al., 2005].

Растителните лектини са известни от няколко десетилетия, но в последните години интересът към тях се възроди поради потенциалът им за диагностика и терапия на тумори. Лектините са разнообразен клас протеини, взаимодействащи обратимо с въглеродородните вериги на повърхността на клетъчните мембрани без да проявяват ензимна активност [Lis & Sharon, 1998]. Мономерните единици на лектините от една и съща фамилия се характеризират с високо ниво на секвенционна и структурна идентичност, варираща само в няколко аминокиселинни остатъка на олигопептидните вериги. Тази фина разлика, обаче, води до изключително голямо разнообразие на четвъртичната структура на лектините, което обуславя различната им специфичност и афинитет към олигозахаридите, влизащи в състава на клетъчните антигени и рецептори [Mody et al., 1995; Chay & Pienta, 2000; Gabius, 2001]. Установено е, че някои лектини проявяват висока специфичност и ясноизразен афинитет към маркерни за туморните клетки олигозахариди [Heldin, 1995; Bouckaert et al., 1999], което ги прави подходящи за разпознаването на туморните клетки от нормалните. Взаимодействайки с клетките, лектините (в зависимост от концентрацията) биха могли да индуцират процеси на цитоаглутинация и цитотоксичност [Ohba et al., 1997; Ohba & Bakalova, 2003].

В наши предишни изследвания установихме, че един от най-високоспецифичните за левкемични лимфоцити лектини е SBA (*Soybean Agglutinin*) [Ohba & Bakalova, 2003]. SBA е тетрамерен протеин (с MW~120 kD), изграден от 4 подобни една на друга алфа-полипептидни вериги. Четвъртичната структура на протеина е с ясноизразен афинитет към галактозил-съдържащи рецептори върху клетъчната повърхност [Loris et al. 2000]. Показано е, че маркирането на SBA с органичния флуорофор FITC не променя съществено афинитета на лектина към съответния олигозахарид, което прави FITC-SBA конюгата подходяща флуоресцентна проба за идентифициране на левкемични клетки от нормални лимфоцити с използване на конфокална микроскопия и флоуцитометрия [Bakalova & Ohba, 2003]. Съществен недостатък на микроскопския анализ, обаче, е краткото време на живот на флуоресценцията на FITC ( $\tau_{1/2}$ ~10 sec), което затруднява силно локализирането на левкемичните клетки в смесените популации, изискващо продължително скениране на всяко едно зрително поле

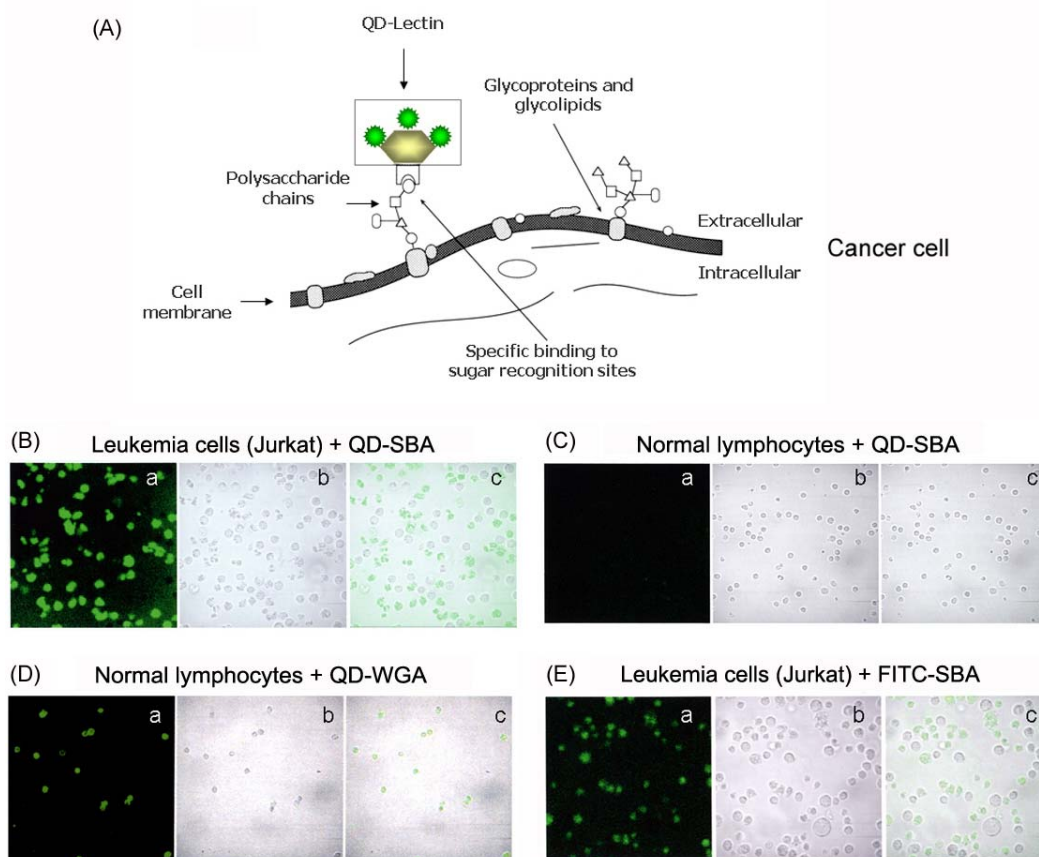
(в рамките на десетина и повече минути). Водоразтворимите QD, характеризиращи се с дълго време на полуживот на флуоресценцията ( $\tau_{1/2} > 6$  h) и висок квантов добив, бяха подходящи за преодоляване на тези ограничения на флуоресцентния микроскопски анализ с FITC. Това ни даде основание да считаме, че QD биха могли да подобрят флуоресцентния тест чрез конюгирането им с лектини и прилагането на хибридни проби за идентифициране на левкемични клетки от нормални лимфоцити с флуоресцентна конфокална микроскопия.

Сравнително големите размери на описаните в литературата високофлуоресцентни водоразтворими QD (около и над 15-20 nm в диаметър) обаче, и още по-големите размери на евентуалните QD-лектинови конюгати (MW на SBA ~120 kDa) поставяха редица неизвестни пред възможните модификации на техния афинитет към туморните клетки и евентуалното им използване във флоуцитометричните анализи. Трудностите при контрола на броя на лектиновите лиганди върху повърхността на една голяма по размер наночастица и конюгирането на 2 и повече лектинови молекули с една QD повишават риска от крос-линкинг на клетките и поява на артефакти при флоуцитометричните анализи.

В хода на нашата работа успяхме да разработим QD-лектинова проба изградена от лектинови молекули, конюгирани с една или няколко QD. Пробата беше приложена за идентифициране на левкемични от нормални лимфоцити на базата на взаимодействието на лектина със съответните олигозахаридни остатъци на специфични рецептори, експресирани на повърхността на левкемичните клетки (**Фигура 15A**). За целта използвахме флуоресцентна конфокална микроскопия и флоуцитометрия.

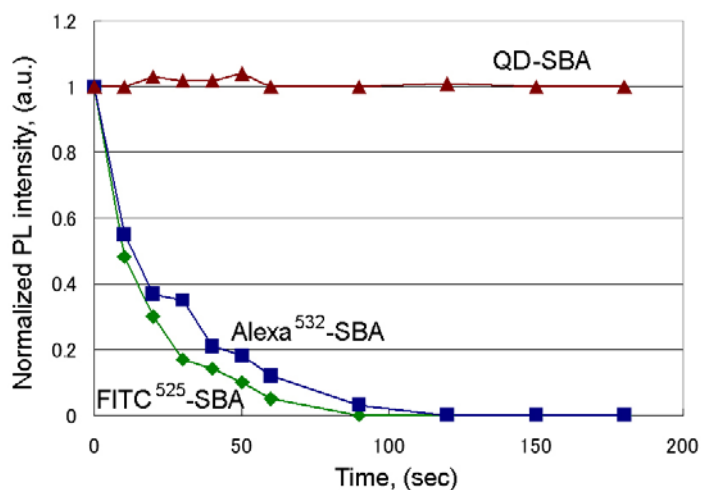
За разработването на QD-лектиновия конюгат използвахме водоразтворимите QD CdSe, описани в раздел I.1. на *Експериментални резултати* и два растителни лектина – SBA и WGA. Съотношението QD:лектин варираше от 1.2:1 до 3:1 (mol:mol). Повишаването на броя на наночастиците в съотношението с лектина, водеше до повишаване на интензитета на флуоресценция на пробата. Това е едно от предимствата на QD пред конвенционалните органични флуорофори. Известно е, че концентрирането на повече от две молекули от органичен флуорофор в малък обем е съпроводено с гасене на флуоресценцията и намаляване на сумарния квантов добив на пробата.

Резултатите на Фигура 15B показват, че QD-SBA взаимодейства специфично с левкемичните клетки от линията Jurkat, изолирана от пациенти с акутна лимфобластна левкемия (ALL), което се дължи на лектиновата компонента. Аналогични резултати бяха получени и с левкемични клетки от линиите MOLT-4 (изолирана от пациенти с ALL), Raji и Daudi (изолирани от пациенти с лимфома на Burkitt). При изследване на чисти клетъчни линии беше установено, че около 10-30% от левкемичните клетки (в зависимост от вида на линията) не взаимодействат с QD-SBA. Тези клетки са в по-ниска степен на диференциация, която се характеризира с ниска експресия на SBA-специфичните галактозил-съдържащи рецептори на тяхната повърхност [Moriwaki et al., 2000; Sallay et al. 2000]. QD-SBA пробата не взаимодействаше с нормалните лимфоцити (Фигура 15C). Това я прави подходящ флуоресцентен маркер за идентифициране на добре диференцирани левкемични лимфоцити от нормални лимфоцити с флуоресцентна микроскопия. Другата QD-лектинова проба (QD-WGA) взаимодействаше както с левкемичните, така и с нормалните лимфоцити (Фигура 15D), което я прави неподходящ флуоресцентен маркер за този анализ. Вижда се също, че флуоресцентната емисия на левкемичните клетки, маркирани с QD-SBA (Фигура 15A), е по-интензивна от тази на левкемичните клетки, маркирани с FITC-SBA (Фигура 15E), независимо че възбуждането на QD се провеждаше при дължина на вълната 480 nm, доста под максимума на възбуждане на този вид наночастици.



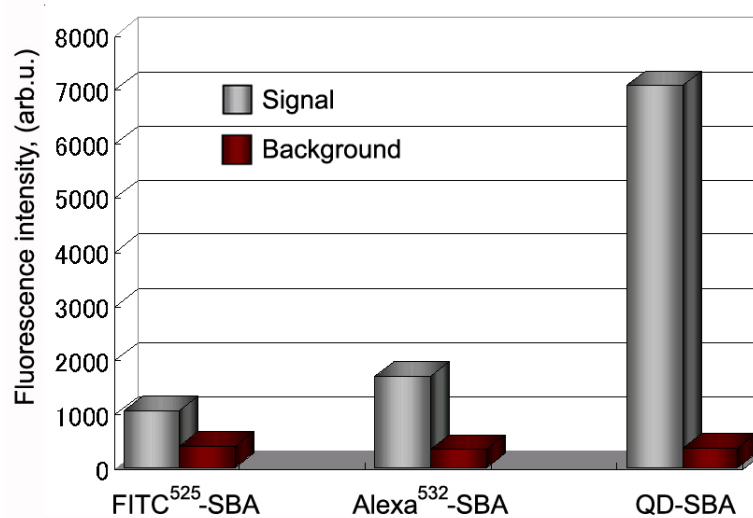
**Figure 15.** (A) Scheme of interaction of QD-lectin with cell surface glycoproteins and glycolipids. (B-E) Fluorescence microscopic imaging of interaction of QD-lectin or FITC-lectin with leukemia cells and normal lymphocytes. Quadrant (a) – fluorescence; quadrant (b) – transmission; quadrant (c) – fluorescence and transmission. QD-lectin or FITC-lectin ( $10 \mu\text{L}$ , containing  $1 \text{ mg}$  lectin/mL) were incubated for 20 min with live leukemia cells (Jurkat) or normal lymphocytes ( $200 \mu\text{L}$ , containing  $2 \times 10^6$  cells per mL) in RPMI-1640 medium, in humidified atmosphere ( $5\% \text{ CO}_2$ ,  $37^\circ \text{C}$ ). Aliquots of the cell suspensions were obtained, washed twice by PBS and analyzed by fluorescence confocal microscopy to detect QD-lectin or FITC-lectin conjugates bound to the cell surface. Olympus IX70 microscope was used in all analyses (excitation at  $480 \pm 10 \text{ nm}$ ; emission filter:  $535 \pm 10 \text{ nm}$ ). WGA – *Wheat Germ Agglutinin*.

При непрекъснато продължително скениране в близък план установихме, че по-ярката флуоресценция на маркираните с QD левкемични клетки при нашите условия на наблюдение, се дължи главно на по-голямата фотохимична стабилност на QD и бавното им фотообезцветяване. Резултатите на **Фигура 16** представят динамиката на флуоресценция на левкемични клетки, белязани с QD-SBA, FITC-SBA и Alexa<sup>532</sup>-SBA при непрекъснато облъчване (възбуждане) в рамките на 3 min. QD-SBA се характеризира със стабилна флуоресцентна емисия, докато флуоресценцията на FITC-SBA и Alexa<sup>532</sup>-SBA намалява бързо в хода на облъчването. Времето на полуживот на флуоресценцията на QD-пробата надвишаваше 30 min, докато времето на полуживот на флуоресценцията на FITC и Alexa<sup>532</sup> беше едва 10-15 sec.



**Figure 16.** Kinetic curves of fluorescence decay of leukemia cells, labeled by QD-SBA, FITC-SBA and Alexa<sup>525</sup>-SBA, during continuous excitation. Mean data from six independent experiments are presented in the figure (SD did not exceed 10%). The measurements were performed as it is indicated on Figure 15.

Анализът на съотношението на интензитета на флуоресцентния сигнал на белязаните левкемични клетки към интензитета на тяхната автофлуоресценция (сигнал/фон) показва, че в случая на QD-SBA можем да получим от 4 до 10 пъти по-голямо съотношение сигнал/фон, в сравнение с FITC-SBA и Alexa<sup>532</sup>-SBA (Фигура 17). Съотношението сигнал/фон на QD-SBA-маркираните клетки нараства с изместването на възбуждащата светлина към късовълновия диапазон на спектъра (Таблица 1). Това е обяснимо, като се има предвид, че автофлуоресценцията на живите обекти е най-висока в спектралния диапазон, намиращ се непосредствено след възбуждащата светлина и намалява с изместване на спектъра в дълговълновата област [Gao et al., 2005].



Substance	Signal-to-background
FITC <sup>525</sup> -SBA	2.72 +/- 0.24
Alexa <sup>532</sup> -SBA	5.12 +/- 0.45
QD-SBA	19.93 +/- 1.72

**Figure 17.** Fluorescence intensity and signal-to-background ratio of leukemia cells, labeled (gray) with FITC<sup>525</sup>-SBA, Alexa<sup>532</sup>-SBA or QD-SBA. Red-chart – autofluorescence of control (non-labeled) cells. Mean data from three independent experiments are presented in the chart (SD did not exceed 10%). Mean +/- SD data are presented in the table. All data were obtained at equal concentrations of cell population (200  $\mu$ L, containing  $2 \times 10^5$  cells/mL) and fluorescent probe (corresponding to 50  $\mu$ g SBA/mL). The data are from spectrofluorimetric analysis in microplate reader. FITC:  $\lambda_{\text{ex}}=480$  nm;  $\lambda_{\text{em}}=525$  nm. Alexa<sup>532</sup>:  $\lambda_{\text{ex}} = 488$  nm;  $\lambda_{\text{em}}=532$  nm. Broad (deep-trap) fluorescent QD:  $\lambda_{\text{ex}} = 365$  nm;  $\lambda_{\text{em}}=525$  nm.

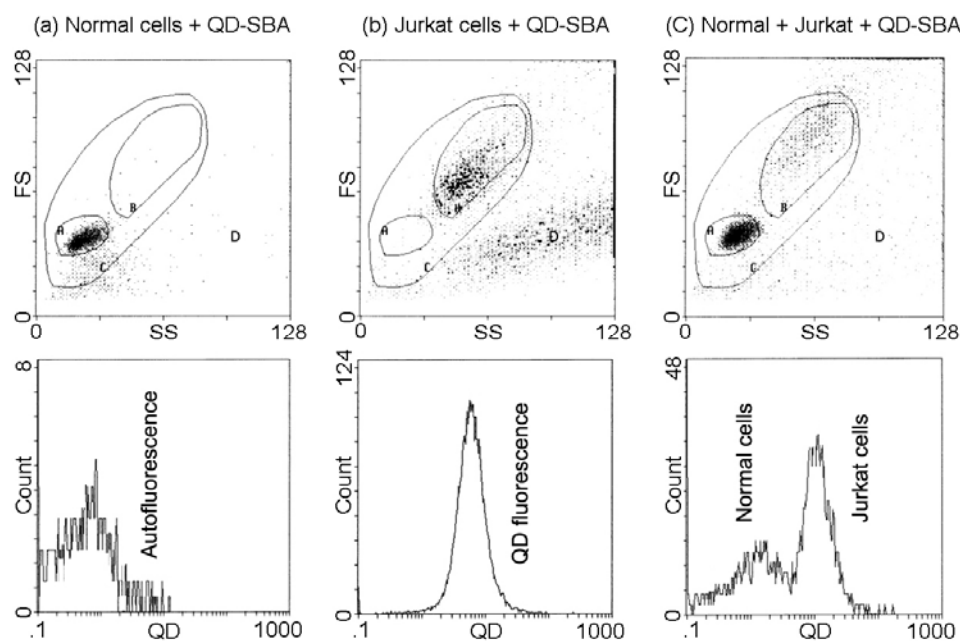
**Table 1.** Signal-to-background ratio of cells, labeled with broad-fluorescent QD-SBA at different excitation wavelengths.

Excitation wavelength	Signal-to-background
365 nm	19.9 +/- 1.7
400 nm	16.5 +/- 1.5
420 nm	11.9 +/- 1.2

*All data were obtained at equal concentrations of cell population (200  $\mu$ L, containing  $2 \times 10^5$  cells/mL) and fluorescent probe (corresponding to 50  $\mu$ g SBA/mL). The data are from spectrofluorimetric analysis in microplate reader. Mean +/- SD values are presented in the table.*

Левкемичните клетки, взаимодействащи с QD-SBA, можеха да бъдат отдиференцирани от нормалните лимфоцити и чрез флоуцитометрия. Хистограмите, представени на **Фигура 18** показват, че в случаите на нормални лимфоцити се регистрира единствено автофлуоресцентният сигнал на клетъчната популация. Хистограмата на Фигура 18-а, представляваща флуоресценцията на нормални лимфоцити, инкубирани с QD-SBA, се припокрива напълно с хистограмата на нормални лимфоцити в отсъствие на QD-SBA. В случаите на левкемични лимфоцити (Jurkat), инкубирани с QD-SBA, е регистриран пик на силно флуоресциращи клетки, разположени вдясно по абсцисата (Фигура 18-б). Хистограмата на смесената популация от левкемични и нормални клетки се характеризира с два пика – автофлуоресценцията на нормалните лимфоцити и QD-флуоресценцията на левкемичните лимфоцити (Фигура 18-с).





Cell type	Viable cells, (%)
Normal lymphocytes + QD-SBA*	92 +/- 7
Jurkat cells + QD-SBA**	82 +/- 11
Normal lymphocytes	93 +/- 8
Jurkat cells	85 +/- 12

\*Calculated from histograms (a); \*\*Calculated from histograms (b)

**Figure 18.** Flow cytometric analysis of interaction of QD-SBA with leukemia cells (Jurkat) and normal lymphocytes. Quadrant A: viable normal cells; quadrant B: viable leukemia cells; quadrant C: all viable cells; quadrant D: all dead cells. SS: side scatter; FS: forward scatter. No cells were excluded from the analysis and ~10,000 cells were count. In the table: a percentage of viable cells (mean +/- SD from 3 independent experiments), calculated from histograms.

Флуоцитометричният анализ позволяваше да се калкулира процентът на живите клетки в популацията и да се оцени евентуалната цитотоксичност на пробата. При краткото време на инкубация на QD-SBA с клетките (20 min) не бяха регистрирани цитотоксични ефекти (Фигура 18 - таблицата).

Получените резултати от флуоцитометричния анализ с използване на QD-лектин не показаха артефакти, което беше доказано с използване на стандартна FITC-SBA проба при същите условия на същата апаратура. Хистограмите, получени с FITC-SBA, бяха идентични с получените с QD-SBA, което дава основание да считаме, че разработената QD-SBA проба е подходящ флуоресцентен маркер за флуоцитометрични анализи.

Нашият колектив беше един от първите, докладвали приложение на QD-проби за флуоцитометричен анализ на клетъчни антигени без артефакти в хистограмите [Zhelev et al., 2005]. В част от изследванията на други колективи, свързани с прилагането на QD във флуоцитометрични анализи на клетки, се посочва, че големите размери на наночастиците и ниската им колоидна стабилност във високосолеви разтвори, каквито са клетъчните среди и цитоплазмата, могат да доведат до агрегация на частиците и артефакти в хистограмите [Telford, 2004; Valet et al., 2004]. Разработената от нас QD-лектинова проба е с висока колоидна стабилност във физиологични

разтвори, което се дължи на нейната уникална структура и физикохимични свойства. Конюгатът има поведението преди всичко на белтъчната компонента, тъй като размерът на QD ( $d < 2$  nm) е доста по-малък от този на лектина и водоразтворимостта на самите наночастици е много висока. Всичко това води до редуциране на риска от агрегация и появата на артефакти във флуоцитометричния анализ на клетки.

\* \* \*

В заключение, представените резултати показват, че разработената QD-лектинова проба – QD-SBA, е подходящ флуоресцентен маркер за идентифициране на високодиференцирани левкемични лимфоцити (Jurkat, MOLT-4, Daudi, Raji) от нормални лимфоцити с използване на флуоресцентна конфокална микроскопия и флуоцитометрия. QD-SBA-маркираните клетки се характеризират с няколко пъти по-висок интензитет на флуоресцентния сигнал от този на клетките, маркирани с FITC-SBA, и на порядък по-стабилна във времето флуоресценция. Това гарантира значително повишаване на чувствителността на флуоресцентния микроскопски анализ. QD-лектиновата проба осигурява възможност за продължително скениране (до 30 и повече минути) без съществено обезцветяване, което улеснява локализирането на обекта и неговия анализ. В допълнение, възможността за продължително скениране позволява да се проследи и изучи механизмът на клетъчната интернализация на лектиновите проби.

Разработената от нас QD-лектинова проба е структурирана по различен начин от описаните до 2005-та година QD-протеинови конюгати. Всички описани дотогава в литературата QD-протеинови конюгати са структурирани от една голяма QD, на чиято повърхност са свързани няколко или много лиганди (респ. макромолекули) [Medintz et al., 2005; Michalet et al., 2005]. QD-пробите, получени на този принцип, са многовалентни и дават възможност много биологични обекти (молекули или клетки) да се свържат с една от тях. В нашето изследване, малките размери на QD ( $d \sim 2$  nm) позволяваха да се разработи проба, изградена от една протеинова молекула (с размери  $\sim 15$ - $30$  nm и повече) и една или няколко QD, конюгиранни със свободните аминок-групи от повърхността на лектина. Така структурираната проба е по-подходяща за изследване на повърхността на клетъчните структури, тъй като запазва валентността на оригиналната биологично-активна компонента – лектиновата молекула.

Изборът на малки по размери наночастици ( $\sim 2$  nm) и ограничаването на съотношението QD:лектин на не по-голямо от 3:1 не повлияваха негативно свързването на пробата с клетките, както и биологичната активност на лектина. Над определена концентрация QD-SBA индуцираше цитоаглутинация при продължително инкубиране с живите левкемични клетки по същия начин, по който и неконюгираният SBA.

Представената в настоящия раздел работа е защитена с японски патент, публикувана е в *Chemical Communications (Cambridge)* [Zhelev et al., 2005], селектирана е за *RCS's Chemical Biology Virtual Journal* и е отбелязана специално в брой 1 на *Molecular BioSystems* (2005).

## **2. Разработване на високочувствителен флуоресцентен имуноблот анализ на протеини, на базата на QD-белязани антители**

Имуноблот анализът е основен аналитичен подход при детекцията на експресията на протеини в клетки и тъкани. Това е един от най-често използваните анализи в молекулярната и клетъчната биология, както и в молекулярната медицина. Понастоящем това е една от основните методологии за валидиране на данните от микроарей анализите в геномните и протеомните изследвания. Анализът е навлязъл също и в биофизиката,

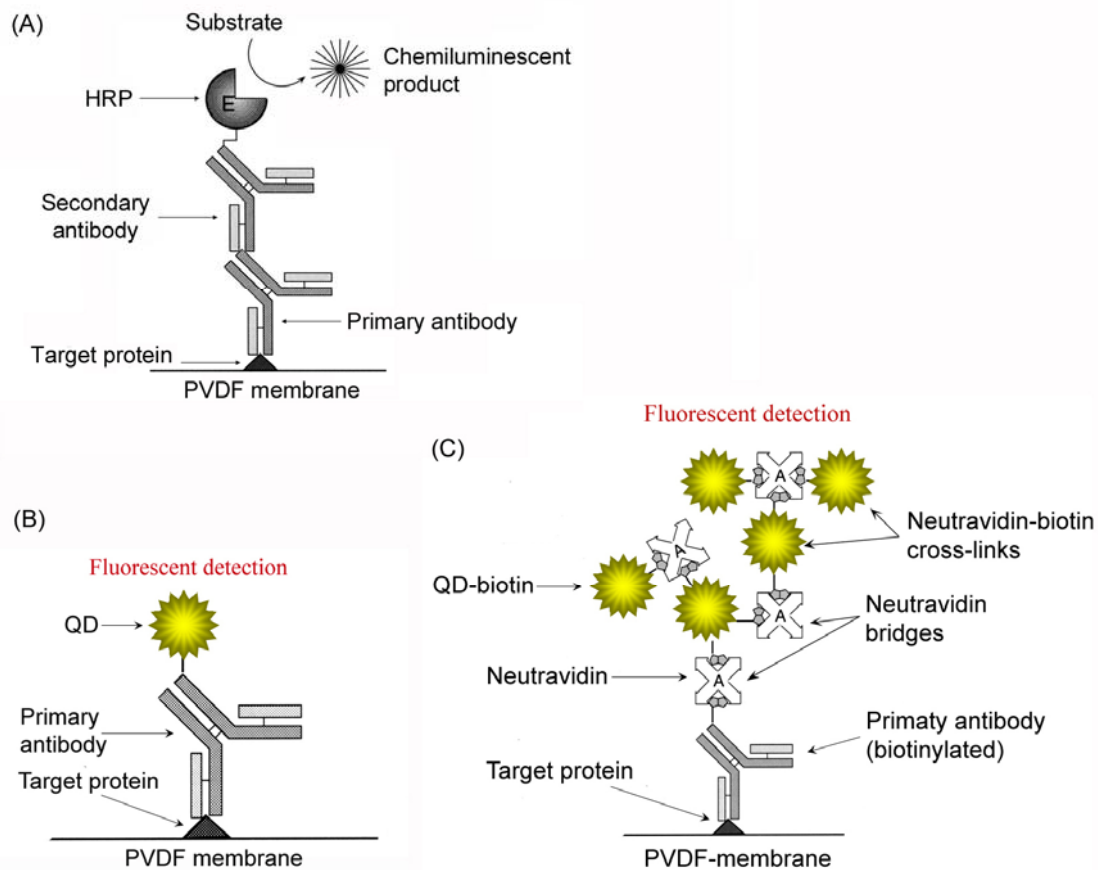
биоорганичната химия, фармакологията и редица други области на науката.

Класическата схема на имуноблот анализ, известен още като Western blot, включва няколко последователни етапа: (i) лизиране на клетките; (ii) фракциониране на протеините чрез гел-електрофореза; (iii) прехвърляне на фракционирани протеини от гела върху PVDF мембрана; (iv) инкубиране на мембраната със серия от антитела – моноклонално („първично антитяло”, взаимодействащо специфично с таргетния протеин) и поликлонално („вторично антитяло”, взаимодействащо с моноклоналното и белязано с ензим – най-често HRP); (v) индуциране на ензимна реакция върху мембраната с добавяне на съответния субстрат; реакцията води до получаване на хемилуминисцентен продукт, локализиран в зоната на таргетния антиген (протеин), който се регистрира като петно (*blot*) върху високочувствителни рентгенови (X-ray) или полароидни филми (Схема 3А). Оттук идва и наименованието на анализа – имуноблот.

Конвенционалният имуноблот анализ страда от няколко недостатъка: (i) анализът е полуколичествен; (ii) продължителен (изискват се над 30 часа); (iii) резултатите са със сравнително ниска възпроизводимост. Стандартната схема не е достатъчно чувствителна за имуноблот анализ на протеини, намиращи се в особено ниски концентрации в клетъчния лизат. Това налага добавянето на още една предварителна стъпка, която включва имунопреципитация на протеините и тяхното концентриране преди електрофоретичното им разделяне. Този допълнителен етап повишава риска от натрупването на артефакти. Всеки един изследовател, използващ този метод в практическата си работа, се е сблъсквал неведнъж с трудности по получаването на възпроизводими количествени изображения от имуноблот анализа.

Независимо от широкото разпространение на метода и неговото над 30-годишно използване в експерименталната практика, не са направени съществени подобрения в процедурата, които да елиминират или поне да сведат до минимум ограниченията и артефактите.

Нашият колектив беше първият, който докладва през май 2004 г. две различни схеми за имуноблот анализ с флуоресцентна детекция, разработени на базата на конюгати QD-антитяло или QD-биотин/неутравидин [Bakalova et al., 2004c, 2005b]. Паралелно с нас, групата на Marcel Bruches също публикува метод за имуноблот анализ на протеини с мултиплексна флуоресцентна детекция с използване на канюгати QD-антитяло [Ornberg et al., 2005]. Макар методологичните подходи да бяха различни и основани на различни технологични предимства на QD, и двете разработки демонстрираха големия потенциал, който имат квантовите точки за повишаване чувствителността на метода, улесняване на детекцията на маркираните антигени, съкращаване на времето на анализа и преодоляване на полуколичествения му характер.



**Scheme 3.** Schemes of conventional (A) and QD-based immunoblot analysis of proteins: (B) “mono-type”; (C) “sandwich type”.

HRP – horse radish peroxidase

В нашата работа използвахме QD с широк спектър на флуоресценция. Наночастиците бяха конюгирани с моноклонални антитела или биотин. Бяха разработени две експериментални схеми. Първата включваше конюгиране на QD със съответното „първично антитяло” и директно флуоресцентно маркиране на антигена, имобилизиран върху мембраната. Тази схема на анализ беше означена като „моно-тип” (Схема 3B). Втората схема включваше взаимодействие на антигена с биотинилирано антитяло, добавяне на неутравидин към комплекса и последващо инкубиране с няколко последователни серии QD-биотин + неутравидин. Тази схема на анализ беше означена като „тип сандвич” (Схема 3C).

Използвайки описаните по-горе експериментални постановки, анализирахме нивото на два протеина – TRF1 (telomeric repeat binding factor; ~56 kD) и Tin2 (TRF1-interacting nuclear protein 2; ~40 kD), асоциирани с ензима теломераза. Известно е, че тези два протеина са ниско експресирани в bcr-abl позитивни клетки, изолирани от пациенти с хронична миелоидна левкемия, каквито са клетките от линията K562 [Ohyashiki et al., 2001; Cook et al., 2002; Bakalova et al., 2004d]. За целта бяха използвани клетъчни лизати от K562, подлагани директно на електрофореза за фракциониране на протеините и последващ имуноблотинг с QD-белязано моноклонално антитяло (QD-анти-TRF1 или QD-анти-Tin2) при „моно-тип” анализа или с биотинилирано моноклонално антитяло (анти-TRF1 или анти-Tin2) и QD-биотин + неутравидин при анализа „тип сандвич”. Двата протеина бяха анализирани и чрез конвенционален имуноблот анализ без предварителна имунопреципитация и концентрация на протеините в лизата. Като стандарт използвахме  $\beta$ -актин, който беше анализиран аналогично

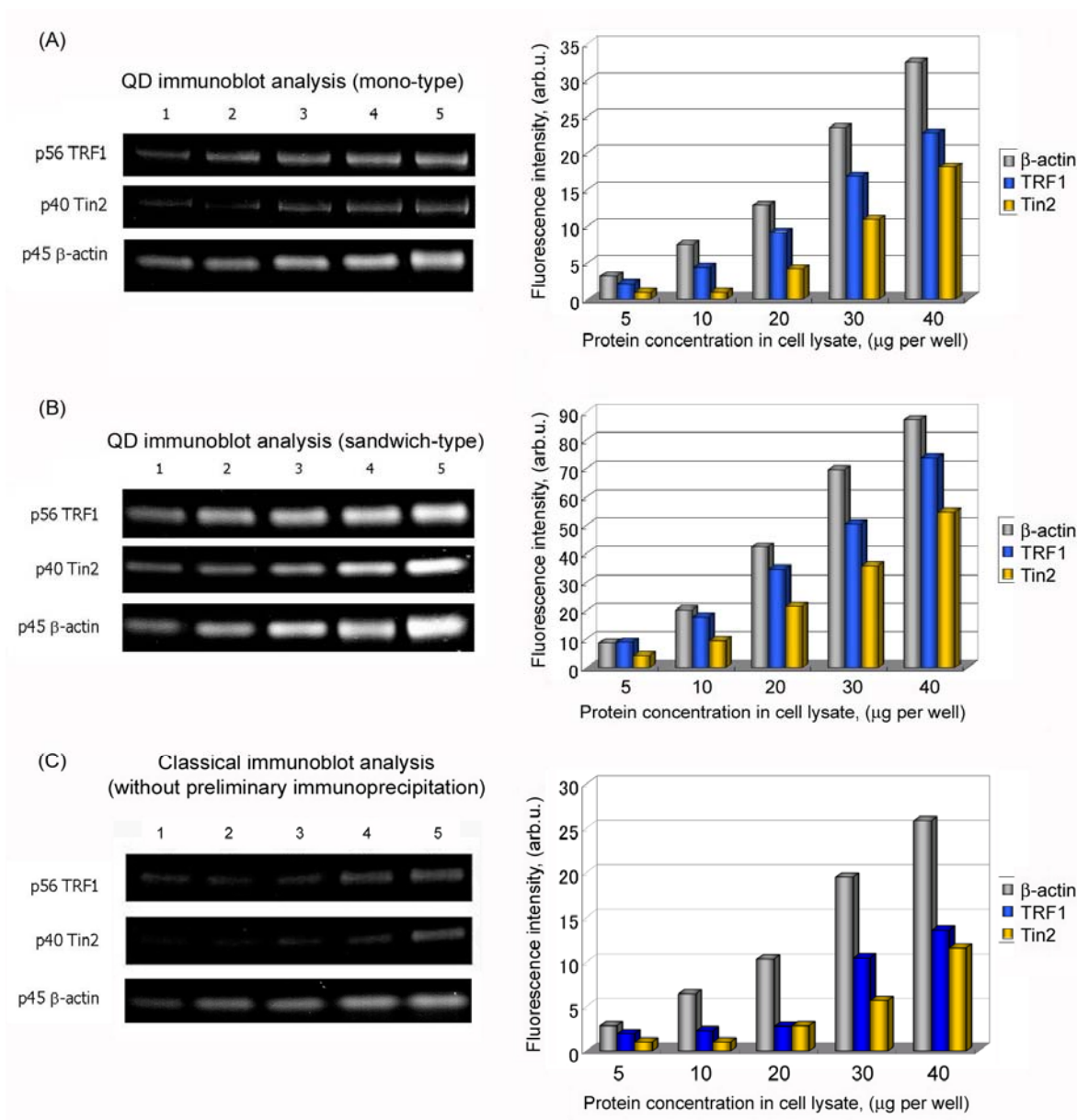
на TRF1 и Tin2 по всяка една от трите схеми, с използване на съответното антитяло (анти- $\beta$ -актин).

На **Фигура 19** са представени типични блотове, получени при няколко различни концентрации на лизата, подложен директно на електрофореза (без предварителна преципитация на протеините).

„Моно-тип” анализът даваше възможност за флуоресцентна детекция на имобилизираните TRF1 и Tin2 върху мембраната при концентрации на изходния лизат 5-40  $\mu\text{g}$  протеин на ямка (Фигура 19А). Анализът се характеризираше с ясноизразена линейна зависимост между концентрацията на лизата (подложен на електрофореза) и флуоресценцията на имобилизираните върху мембраната и маркирани с QD-антитяло протеини TRF1 и Tin2. Чувствителността на метода беше достатъчно висока за детекция на TRF1 и  $\beta$ -актин. Интензитетът на флуоресценция на блотовете, обаче, беше доста слаб, за да се визуализира Tin2 при ниските концентрации на протеин в изходния лизат. „Моно-тип” анализът не позволяваше да се направи диференциация на концентрациите на Tin2 по интензитета на флуоресценция на блота в интервала 5-10  $\mu\text{g}$  протеин на ямка. Концентрация на лизата от 10  $\mu\text{g}$  протеин на ямка би могла да се приеме за долна граница на чувствителността на „моно-тип” анализа за Tin2. Използването на QD с квантов добив над 50% би повишило чувствителността на флуоресцентната детекция при тази схема на анализ и би позволило прилагането на метода и при по-ниски концентрации на изходния клетъчен лизат. Използването на QD-белязано първично антитяло и директната детекция на флуоресценцията на блотовете с апаратура за флуоресцентен имиджинг съкращаваше времето за анализ на TRF1 и Tin2 – от  $\sim 31$  часа при класическия имуноблот анализ на  $\sim 25$  часа при QD-имуноблота „моно-тип”. Недостатък на „моно-тип” анализа беше сравнително високата цена на QD-белязаното моноклонално антитяло.

QD-имуноблот анализът „тип сандвич” се характеризираше със значително по-висока чувствителност от „моно-тип” анализа, поради наличието на множество QD-биотин-неутравидинови комплекси, omрежени върху таргетния протеин, водещи до значително усилване (мултиплициране) на флуоресцентния сигнал (Фигура 19В). Беше регистрирана линейна зависимост между интензитета на флуоресценция на блотовете (TRF1, Tin2 и  $\beta$ -актин) и концентрацията на протеин в изходния лизат в диапазона 5-40  $\mu\text{g}$  протеин на ямка. Чувствителността на метода позволяваше детекция на TRF1 и Tin2 в лизати с концентрация на протеин под 5  $\mu\text{g}$  на ямка. Мултиплицирането на флуоресцентния сигнал при тази схема на анализ е уникално свойство на QD и е невъзможна при използване на органични флуорофори като маркери на биотина или неутравидина. При конвенционалните органични флуорофори, концентрирането на множество молекули върху малка повърхност или обем води до гасене на флуоресценцията [Tan et al., 2004; Park et al., 2006a; Soto et al., 2006].

Фигура 19С представя класически имуноблот анализ на TRF1 и Tin2 без предварителна имунопреципитация на таргетните протеини. Вижда се, че този аналитичен подход се характеризира с по-ниска чувствителност от QD-имуноблот анализа „тип сандвич”. Класическият имуноблот анализ беше и с около 5 часа по-продължителен от QD-имуноблота „тип сандвич”.



**Figure 19.** Immunoblot analysis of TRF1, Tin2 and  $\beta$ -actin in cell lysates, isolated from K562 cells. Concentration-dependent blots of TRF1, Tin2 and  $\beta$ -actin are presented on the left part, and the respective histograms – on the right part. (A) Classical immunoblot analysis with chemiluminescence detection; (B) QD-based immunoblot analysis – “mono-type” with fluorescence detection; (C) QD-based immunoblot analysis – “sandwich type” with fluorescence detection. Numbers 1-5 in the blots corresponded to proteins, fractionated directly from cell lysates applied on the gel in: 5, 10, 20, 30, and 40  $\mu$ g protein per well. The images in (B) and (C) were generated using identical exposure time (15 min) and excitation/emission settings. Mean data from four independent experiments are shown in the histograms (SD did not exceed 20%).

Представените на Фигура 19А,В блотове се характеризираха с постоянен интензитет на флуоресцентната емисия при продължително облъчване и скениране. Това позволяваше интегриране и допълнително акумулиране на флуоресцентния сигнал, което водеше до повишаване на качеството на получените изображения и техния количествен анализ. При QD-имуноблот анализа „моно-тип” флуоресцентната емисия беше константна до 20-та минута от началото на скенирането, а при „тип сандвич” – до 30-та минута, след което се наблюдаваше

слабо понижаване на интензитета на флуоресценцията – най-вероятно като резултат от фоторазграждането на неопакования с допълнителни обвивки QD.

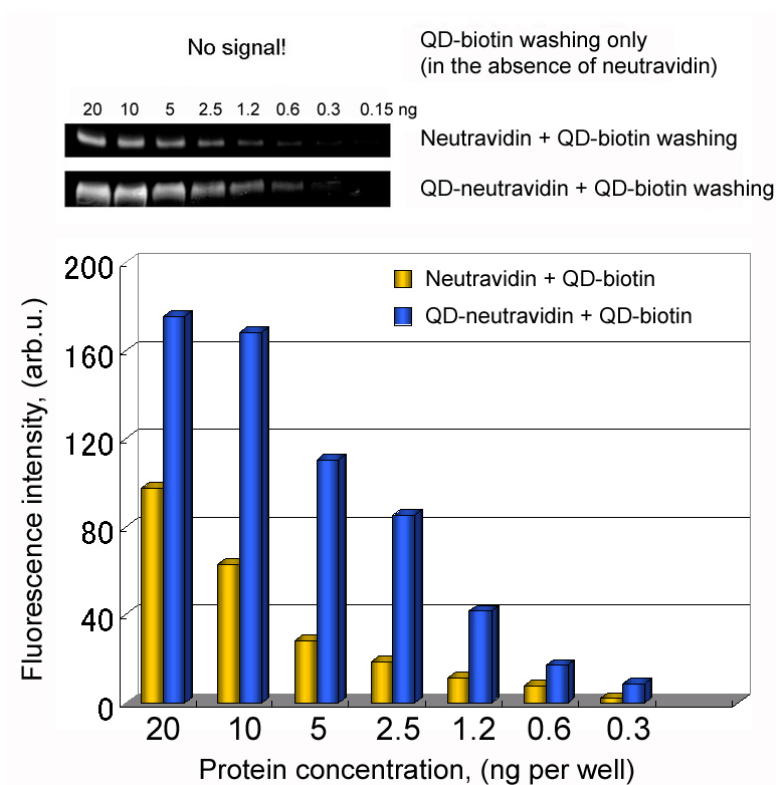
Флуоресценцията на блотовете се запазваше дълго (няколко седмици) при съхраняване на PVDF-мембраните в буфер при 4 °C.

Чувствителността на QD-имуноблот анализа беше изследвана и с разтвори на чист протеин (албумин), с известни концентрации – от 20 до 0.15 ng на ямка. Чувствителността на анализа „тип сандвич” беше ~0.3 ng протеин на ямка, а на „моно-тип” анализа – ~1.2 ng протеин на ямка. Препоръчително е обаче, анализът „тип сандвич” да се прилага за протеини, чиито концентрации в клетъчния лизат са над 1.2 ng на ямка. Това би позволило да се регистрира както експресия на протеина, така и инхибиране на експресията. „Моно-тип” анализът би следвало да се прилага за протеини, чиито концентрации в клетъчния лизат са над 10 ng на ямка.

Интензитетът на флуоресценция на блотовете, респ. чувствителността на QD-анализа „тип сандвич”, можеше да бъде повишена с използване на няколко инкубации с QD-биотин + QD-неутравидин (**Фигура 20**). Недостатък на тази процедура беше, че при концентрации над 10 ng протеин на ямка се достигаше насищане на флуоресцентния сигнал, което препятстваше отдиференцирането на концентрационните разлики.

Чувствителността на QD-имуноблот анализа би могла да се повиши неколкосткратно и с използване на QD с по-висок квантов добив. През 2005-та година, Ornberg et al. описаха мултиплексен QD-имуноблот анализ на пречистени белтъци (по класическата схема; с използване на QD-белязано вторично антитяло) с чувствителност до 20 pg протеин на ямка. Използваните в нашите анализи QD бяха с квантов добив ~40-45%, докато тези на Ornberg et al. са с квантов добив ~70-75%.

QD-имуноблот анализът „тип сандвич” се характеризираше с висока специфичност. При инкубиране на мембраната с QD-биотин в отсъствие на неутравидин не се регистрираше флуоресцентен сигнал (**Фигура 20**). Трябва да се отбележи също, че използването на неутравидин вместо авидин като лиганд на биотинилираното моноклонално антитяло увеличаваше значително специфичността на флуоресцентната детекция на таргетния антиген. Неутравидинът се характеризира с висока специфичност за биотинилираните антитела, докато авидинът взаимодейства неспецифично и с някои небиотинилирани протеини и внася артефакти в имуноблот анализа.



**Figure 20.** “Sandwich type” QD-based immunoblot analysis of protein standard (albumine) in known concentrations (two-serial dilutions, starting from 20 ng per well) using different washing procedures. Concentration-dependent blots of albumine are presented on the top part, and the respective histograms – on the bottom part. The images were generated using identical exposure time (15 min) and excitation/emission settings. Mean data from four independent experiments are presented in the histogram (SD did not exceed 20%).

Понастоящем QD намират все по-широко приложение в имуноблот анализа на протеини. След публикуване на първите работи в това направление през 2005 [Bakalova et al., 2005b; Ornberg et al., 2005] редица колективи успешно прилагат QD-имуноблота за високочувствителна детекция на протеини [Markidez et al., 2005; Tully et al., 2006; Kim et al., 2008; Xiao et al., 2008; Chen et al., 2009; Seleverstov et al., 2009; Scholl et al., 2009; Vu & Liu, 2009; Zhang et al., 2009]. Chen et al. (2009) докладваха чувствителност от порядъка на 30 pg протеин при използване на авидин-функционализиран POLY-QD (CdTe) [Chen et al., 2009], а Scholl et al. (2009) – чувствителност от порядъка на 0.2 pg протеин [Scholl et al., 2009].

\* \* \*

В заключение, представените по-горе експериментални резултати демонстрират предимствата на QD-имуноблот анализа „тип сандвич“ пред класическия имуноблот анализ за детекция на протеини, намиращи се в особено ниски количества в клетъчните лизати. QD-имуноблот анализът „тип сандвич“ обезпечава по-висока чувствителност на детекцията, по-дълго време на скениране на мембраната без съществена промяна на флуоресцентния сигнал, интегриране и акумулиране (мултиплициране) на сигнала и получаване на по-висококачествени изображения. Избягването на предварителната имунопреципитация и концентриране на таргетните протеини, както и директната детекция на флуоресценцията в имиджер съкращаваха значително времето за анализ (от ~31 часа при класическия имуноблот анализ на ~26 часа при QD-имуноблота „тип



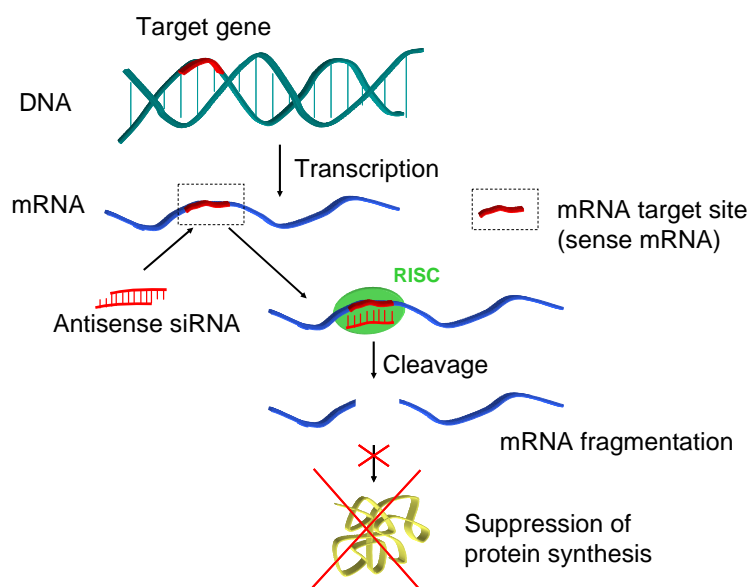
сандвич’). QD-имуноблот анализът се характеризираше също с висока специфичност към таргетния антиген и свеждане до минимум на артефактите.

Разработеният метод е защитен с японски патент за продукт. Резултатите са публикувани в няколко американски издания [Bakalova et al., 2005b; Zhelev et al., 2006; Bakalova et al., 2007a] и са отбелязани на страниците на няколко японски публицистични издания.

### 3. Разработване на FRET-анализ за селекция на siRNA секвенции с висок афинитет към таргетната mRNA на базата на QD-белязани хибридационни проби

РНК интерференцията (RNAi) е механизъм за високоспецифично повлияване на генната експресия, индуцирано от двойноверижна РНК (от екзогенен или ендогенен произход). Този механизъм е изключително ефективен и добре известен в растенията и безгръбначните животни [Montgomery et al., 1998; Baulcombe, 1999; Kennerdell & Carthew, 2000]. Въвеждането на дълга двойноверижна РНК (над 50 нуклеотидни бази – 50 bp) в клетки на бозайници, обаче, провокира интерферонов отговор и неспецифично повлияване на генната експресия. По-късно се оказва, че това не важи за РНК молекули, по-къси от 30 bp, които могат да бъдат и изкуствено синтезирани. За първи път RNAi в клетки на бозайници беше описана през 2001 в *Nature* [Elbashir et al., 2001]. В този случай, РНК интерференцията се индуцира от екзогенни късоверижни РНК секвенции, наречени siRNA (small interfering RNA).

siRNA са двойноверижни РНК-молекули, изградени най-често от ~21-23 bp, като една от веригите им е комплементарна на определен таргетен участък от матричната РНК (mRNA), отговорна за експресията на даден ген и синтезата на даден протеин. Свързвайки се с комплементарния участък на mRNA, siRNA индуцира нейното фрагментиране и стопа синтезата на съответния протеин чрез активиране на определен ензимен комплекс – RISC (Схема 4) [Saunders & Barber, 2003; Bartel, 2004]. Таргетният mRNA участък се означава като сенс-mRNA, а комплементарната на него siRNA верига – като антисенс-siRNA. Няколко siRNA молекули, попаднали в клетката, са достатъчни, за да подтиснат високоспецифично и ефективно експресията на таргетния ген.



Scheme 4. Principle of RNA interference. RISC – RNA-induced silencing complex.

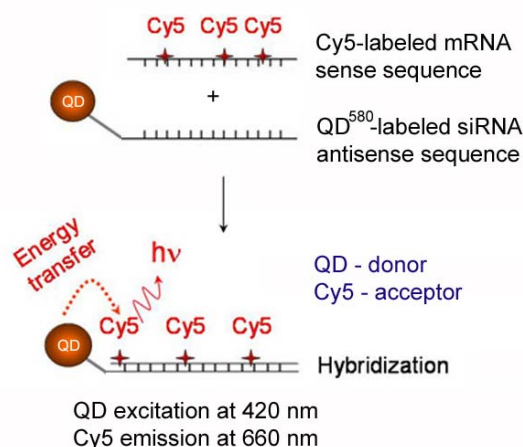
Това откритие постави началото на нова ера в геномните изследвания и повиши очакванията за решаване на проблемите на генната терапия, специално при тумори, вирусни инфекции и вродени генетични заболявания. Все още, обаче, е твърде рано да се оцени реалният потенциал на този механизъм, тъй като съществуват редица въпросителни при неговото прилагане на нативни клетки и експериментални животни *in vivo*.

Повлияването на експресията на таргетния ген от антисенс-siRNA зависи преди всичко от нейния *достъп* и *специфичен афинитет* за комплементарния участък от сенс-mRNA. Специфичният афинитет зависи от много фактори, но най-вече от това дали съществуват или не подобни комплементарни участъци в други mRNA извън интересувания ни таргет, докато достъпът зависи преди всичко от труднопредсказуемата вторична структура на mRNA. Така подбирането на строго специфична и реално действаща siRNA за определен ген се затруднява изключително много. Към 2003-2004 бяха разработени първите софтуерни продукти за подбор на подходящи антисенс-siRNA секвенции [[www.ambion.com/techlib/mics/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/mics/siRNA_finder.html); <http://design.RNA.jp>]. Тези продукти се базираха на няколко правила за селекция на високоефективни siRNA секвенции, формулирани от групата на K. Saigo на базата на систематично експериментално изследване върху 62 siRNA [Ui-Tei et al., 2004; Naito et al., 2004]. Независимо от непрекъснатото подобряване на алгоритмите за селекция на siRNA и появата на нови и нови софтуерни продукти за тази цел, обаче, тези продукти препоръчваха обикновено около 100-300 подходящи siRNA секвенции за даден ген, които бяха свеждани до 10-15 след тестване за хомоложност и специфичност. Най-често само една-две от тези 10-15 подбрани секвенции проявяваха реален антисенс ефект на нативни клетки, поради силно затруднен достъп до съответната mRNA. По-нататъшното подобряване на алгоритмите за софтуерна селекция на високоефективни siRNA секвенции ставаше преди всичко на базата на публикувани експериментални данни и разработването на siRNA-банка (база данни), от което нямаше особена полза при работа с недобре проучени гени.

Това налагаше да се синтезират много siRNA секвенции – комплементарни на различни участъци от таргетната mRNA и да се тества тяхната антисенс активност. Големият и продължителен експериментален скрининг с цел да се подберат най-ефективните антисенс-siRNA секвенции за повлияване на експресията на даден ген, базирайки се на принципа на пробата и грешките, оскъпяваше много изследванията в тази област.

Всички тези проблеми изваждаха на преден план необходимостта от разработването на методи за експериментален скрининг на високоефективни антисенс-siRNA секвенции и прогнозиране на техния RNAi ефект преди да се приложат на нативни клетки и експериментални животни.

През 2004-2005 разработихме флуоресцентен метод за експериментален скрининг на антисенс-siRNA секвенции с висок афинитет към съответната таргетна mRNA. Секвенциите бяха подбрани след предварителна рестрикция с използване на базите данни за проверка на хомоложността (GenBank, BLAST, Ensemble Genome Browser). Методът се базираше на разработването на QD-конюгирани олигонуклеотиди (олиго-DNA – 21-23 бази; еквивалентни на селектираните siRNA секвенции; наречени по-долу „хибридизационни проби” или QD-siRNA) и Cy5-белязана таргетна cRNA (амплифицирано копие на bcr-abl mRNA, наречена „хибридизационен образец” или Cy5-mRNA). Bcr-abl mRNA кодира генетичната информация за bcr-abl тирозин-киназата – маркерен ензим за левкемични клетки, изолирани от пациенти с хронична миелоидна левкемия. При разработването на метода изхождахме от принципите и условията за флуоресцентен резонансен енергетичен пренос между двата флуорофора във FRET-двойката QD<sup>580</sup>/Cy5 (Схема 5).

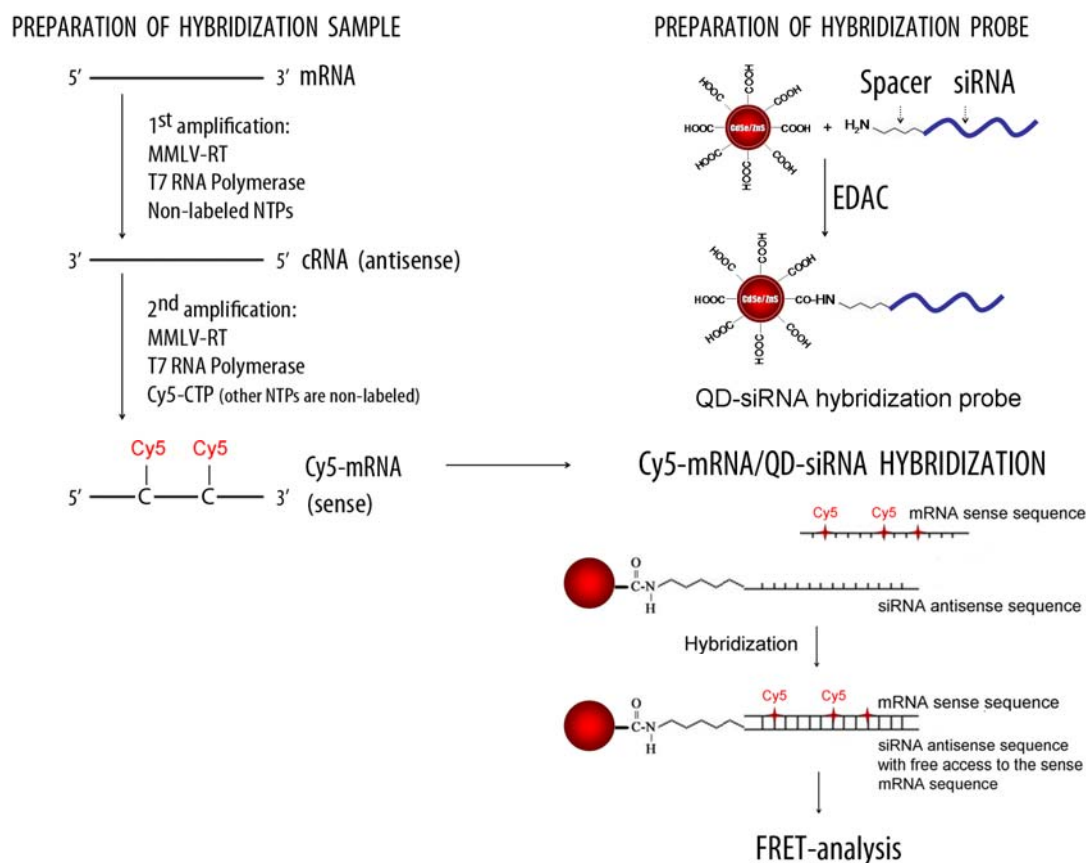


**Scheme 5.** Scheme of FRET between QD-siRNA and Cy5-mRNA. QD-Cy5 FRET pair was characterized with the following spectral characteristics: QD:  $\lambda_{em}^{max} = 580$  nm;  $\lambda_{ex} = 420$  nm; fwhm  $\sim 32$  nm; Cy5:  $\lambda_{ex}^{max} = 640$  nm;  $\lambda_{em}^{max} = 660$  nm. An emission of Cy5 was not detected at  $\lambda_{ex} = 420$  nm in the absence of QD.

В последните няколко години принципите на FRET навлязоха широко в разработването на нови високоспецифични и високочувствителни *in vitro* биоаналитични методи с флуоресцентна детекция като „Real-time PCR” [Gudmundsson et al., 2003], ДНК хибридационни анализи [Yurke et al., 2000; Dubertret et al., 2001; Chan & Holmes, 2004; Riegler et al., 2008], оценка на динамиката на теломеризация и ДНК репликация [Patolsky et al., 2003], изследване на взаимодействията между протеини, нуклеинови киселини и малки молекули [Howarth et al., 2005; Kalin-Neumann et al., 2007; Medintz et al., 2009b]. Разработеният от нас FRET-анализ за селекция на siRNA секвенции с висок афинитет към таргетната bcr-abl mRNA е едно допълнение към този набор от нови високочувствителни аналитични методи с флуоресцентна детекция.

Принципна схема на метода е представена на **Фигура 21**. За получаване на конюгатите QD-siRNA баха използвани водоразтворими QD (карбокси-функционализирани) с тесен спектър на флуоресцентна емисия с максимум на 580 nm (QD<sup>580</sup>) и среден диаметър на наночастиците  $\sim 4.5$  nm (описани в раздел I.2. на *Експериментални резултати*) и аминокиселини олигонуклеотиди. Cy5-mRNA беше получена по стандартен протокол за маркиране и амплификация (вж. раздел II.3. на *Материали и методи*).

За хибридацията на антисенс-siRNA секвенции със затруднен достъп до хомоложния й сенс-mRNA участък и формирането на стабилен siRNA/mRNA дуплекс се изисква продължителна инкубация на 65 °C, най-често повече от 5 часа. Само при изключително улеснен достъп и много висок афинитет на хомоложните секвенции, хибридацията протича бързо с формиране на стабилни siRNA/mRNA дуплекси. Ето защо, в нашата работа беше използвано кратко време на хибридация (1 час) като критерий за селекция на siRNA секвенции с улеснен достъп и висока специфичност и афинитет към таргетната mRNA. Степента на хибридация беше оценявана по ефективността на FRET между двата флуорофора – QD<sup>580</sup> като донор и Cy5 като акцептор на енергия.



**Figure 21.** Preparation of Cy5-mRNA (a hybridization sample) and QD-siRNA (a hybridization probe), and FRET-based analysis of hybridization between both substances – scheme of experiment.

При разработването на FRET-анализи е необходимо да се спазват две условия: (i) за *близост между донора и акцептора*; и (ii) за *съвместимост между донора и акцептора*. За да се гарантира условието за съвместимост при FRET, QD бяха подбрани така, че емисионният им спектър да се припокрива със спектъра на възбуждане на Cy5, без да се регистрира флуоресценция на наночастиците в зоната на емисия на Cy5. За да се гарантира условието за близост при FRET, QD-пробата беше конструирана така, че разстоянието между QD и Cy5 да бъде в рамките на Фьорстеровия радиус (1-10 nm). За тази цел, при разработването на конюгатите QD-siRNA използвахме amino-модифицирани откъм 5'-края олигонуклеотиди, конюгирани с няколко различни по дължина незаредени amino-спейсъри (изградени съответно от 22, 31, 39 и 72 атома – с приблизителна дължина от 2.9 до 8.9 nm) [Bakalova et al., 2005a]. Дължината на спейсъра беше изчислена с помощта на *HyperChem* софтуер. При подбора на дължината на спейсърите изхождахме от следните съображения: (i) да се улесни конюгирането на отрицателно заредената QD с отрицателно заредения олигонуклеотид; (ii) да се избегне или поне да се сведе до минимум стеричното влияние на сравнително голямата наночастица върху процеса на хибридизация между хомоложните олигонуклеотидни секвенции (siRNA/mRNA). Беше установено, че ефективността на хибридизация нараства с нарастване дължината на спейсъра. Като най-оптимален вариант за целите на разработвания от нас метод беше избран 39-атомният спейсър. Той осигуряваше максимална степен на хибридизация и разстояние от ~5 nm между QD и олигонуклеотида, върху който следва да се разположат акцепторните Cy5 молекули след формиране на дуплексите siRNA/mRNA. Така разработената от нас „хибридизационна проба“ (QD-siRNA) се състоеше от карбокси-функционализирана QD и модифициран с

39-атомен спейсър олигонуклеотид (21-23 b). Средното съотношение QD:олигонуклеотид в конюгата беше ~1:6.2.

Секвенциите на олигонуклеотидите подбихме по литературни данни, доказващи техния антисенс ефект срещу bcr-abl mRNA (респ. bcr-abl тирозин киназата), чрез използване на конвенционални методи (RT-PCR и имуноблот) (Таблица 2) [Scherr et al., 2003; Zhelev et al., 2004]. Една от използваните секвенции (siRNA-6) не беше хомоложна на bcr-abl mRNA и тази “mismatch” проба QD-siRNA-6 не хибридираше със Cy5-mRNA. QD-siRNA-6 беше използвана като контрола за детекция на базовата линия в разработения от нас FRET-анализ. Резултатите с siRNA-6 бяха използвани като критерий за оценка на QD-опосредстваната Cy5 емисия като резултат на случайни събития (напр., висока концентрация на двата флуорофора в системата). FRET-сигналите, получени с подобрите антисенс siRNA секвенции (siRNA-1, -2, -3, -4 и -5), бяха нормирани към този на контролата (siRNA-6).

**Table 2.** RNA interference of bcr-abl mRNA and bcr-abl protein levels in K-562 cells.

siRNA sequence	Mode of treatment	Bcr-abl mRNA, (% from control)	Bcr-abl protein, (% from control)	Ref. No
siRNA-1	6 days*	45.7±11.2 <sup>a</sup>	73.4±14.7 <sup>c</sup>	Refs. [1]
siRNA-2	6 days*	8.3±5.1 <sup>a</sup>	44.5±10.5 <sup>c</sup>	Refs. [1]
siRNA-3	6 days*	9.9±5.6 <sup>a</sup>	51.8±9.8 <sup>c</sup>	Refs. [1]
siRNA-4	24 hours**	24.8±3.7 <sup>b</sup>	-	Ref. [2]
siRNA-5	24 hours**	32.4±1.2 <sup>b</sup>	-	Ref. [2]
siRNA-6 (mismatch)	6 days*	100 <sup>a</sup>	100 <sup>c</sup>	Refs. [1]

\*Three repetitive siRNA transfections (single dose – 60 nM) every two days, using lipofectamine. The analyses were carried out 48 hours after the 3<sup>rd</sup> transfection.

\*\*One siRNA transfection (single dose – 0.5 µg), using electroporation. The analyses were carried out 24 hours after the transfection.

<sup>a,b,c</sup>The data are mean±SD from seven (a), fore (b) and five (c) independent experiments.

siRNA-6 represents the subsequent control – K-562 cells, treated with mismatch siRNAs within 6 days.

[1] Zhelev et al., 2004; [2] Scherr et al., 2003.

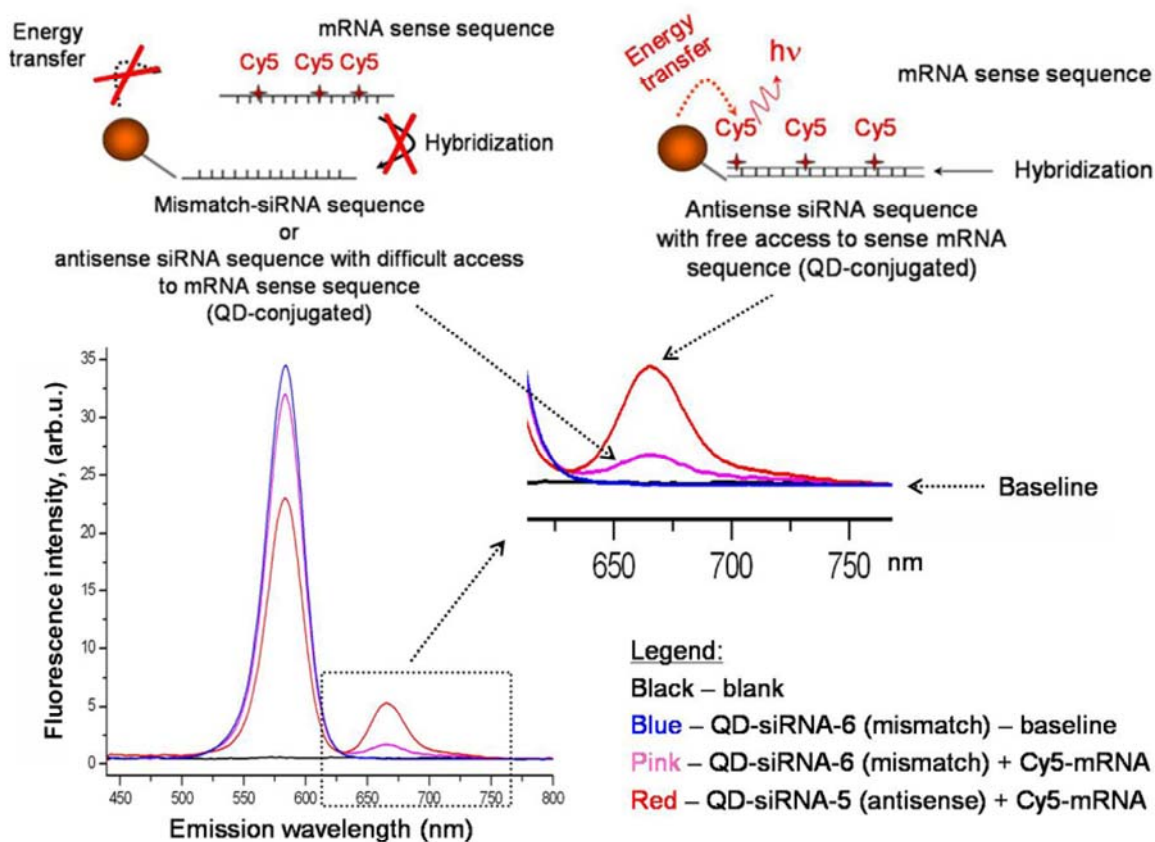
**Фигура 22А** представя типични емисионни спектри на QD (с максимум на 580 nm) и Cy5 (с максимум на 660 nm) при  $\lambda_{ex} = 420$  nm в отсъствие и при наличие на хибридизация между QD-siRNA и Cy5-mRNA. При комбинацията QD-siRNA-6 + Cy5-mRNA се регистрира много слаб флуоресцентен сигнал на 660 nm (Фигура 22А), без да е налице хибридизация между двете некомплементарни секвенции (Таблица 3). Този FRET-сигнал е показателен за енергетичен пренос между двата флуорофора като резултат от случайни събития. При комбинацията на комплементарни секвенции QD-siRNA-5 + Cy5-mRNA се появява ясноочертан флуоресцентен пик на 660 nm при  $\lambda_{ex} = 420$  nm (Фигура 22А-спектъра в червено). Този пик е показателен за енергетичен пренос между двата флуорофора в резултат на хибридизация между siRNA и mRNA секвенциите.

Диаграмата на Фигура 22В представя ефективността на FRET при петте антисенс QD<sup>580</sup>-siRNA секвенции, в резултат на хибридизацията им със Cy5-mRNA. Вижда се, че FRET-сигналят нараства в реда: siRNA-5 > siRNA-1 > siRNA-4 > siRNA-2 = siRNA-3.

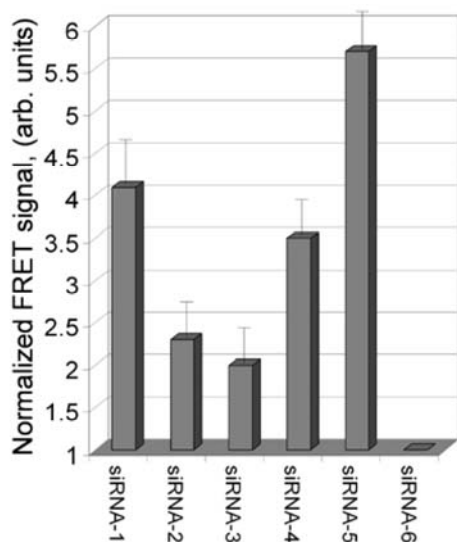
Чрез серия от двукратно разреждане установихме, че долната граница на чувствителност на метода беше 40

nM mRNA:120 nM siRNA. Под това концентрационно съотношение беше невъзможно да се регистрира FRET-сигнал при едновременна хибридизация между компонентите.

(A)



(B)



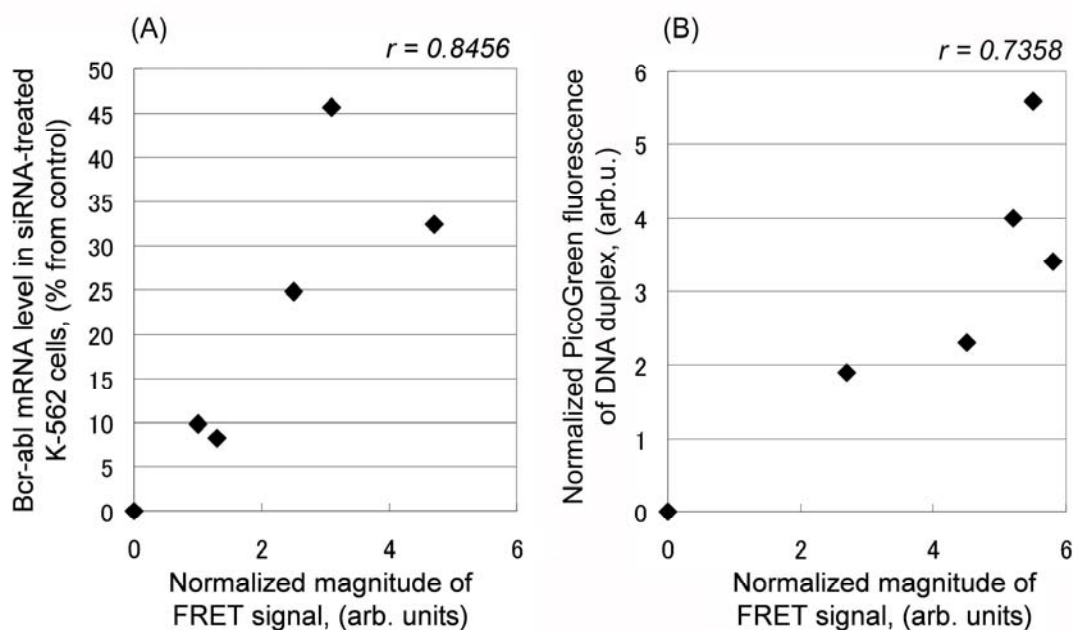
**Figure 22.** (A) Typical fluorescence spectra of non-hybridized and hybridized QD-labeled siRNA probe with Cy5-labeled mRNA sample ( $\lambda_{ex} = 420$  nm). Blue spectrum: QD-siRNA-6 (mismatch); Pink spectrum: QD-siRNA-6 (mismatch) + Cy5-mRNA; Red spectrum: QD-siRNA-5 (antisense) + Cy5-mRNA. (B) Normalized FRET signal between QD-siRNA (1.5  $\mu$ M) and Cy5-mRNA (150 nM). Mean  $\pm$  SD from seven independent experiments for siRNA-1, -2, and -6, and from six independent experiments for siRNA-3, -4, and -5 are presented in the figure.

Паралелно с FRET анализа изследвахме и степента на хибридизация на небелязани siRNA секвенции с небелязана bcr-abl mRNA (Таблица 3). За целта използвахме олигодезоксинуклеотидни копия на siRNA, cDNA копие на bcr-abl mRNA и PicoGreen-тест за детекция на дуплексите (вж. раздел III.6. на *Материали и методи*). Резултатите показаха, че съществува добра положителна корелация ( $r=0.7358$ ) между ефективността на FRET в системата QD-siRNA + Cy5-mRNA и степента на хибридизация между комплементарните секвенции (**Фигура 23B**). Добра положителна корелация ( $r=0.8456$ ) беше регистрирана и между ефективността на FRET в системата QD-siRNA + Cy5-mRNA и антисенс ефекта на siRNA секвенциите, определен чрез RT-PCR (Фигура 23A). Трябва да се уточни, че данните от RT-PCR анализа са получени от различните авторски колективи при използване на различни експериментални протоколи.

**Table 3.** Efficiency of siRNA/mRNA hybridization analyzed by PicoGreen using cDNA analogues.

Oligodeoxynucleotide sequence corresponding to	Normalized PicoGreen fluorescence of DNA-duplexes at 520 nm (arb. u.)*
siRNA-1	$5.2 \pm 2.8$
siRNA-2	$4.5 \pm 2.6$
siRNA-3	$2.7 \pm 1.1$
siRNA-4	$5.8 \pm 2.1$
siRNA-5	$5.5 \pm 2.9$
siRNA-6 (mismatch)	0

\*Data are normalized to PicoGreen fluorescence of ss/cDNA.  $\lambda_{ex} = 420$  nm.



**Figure 23.** (A) Correlation between FRET data (in Figure 22B) and antisense effect of anti-bcr-abl siRNAs on the level of target mRNA (obtained from the literature – Table 2). (B) Correlation between FRET data (in Figure 22B) and siRNA/mRNA-equivalents hybridization efficiency (Table 3).  $r$  – correlation coefficients

Както беше посочено в началото на настоящия раздел, 39-атомният спейсър в QD-siRNA пробата осигурява дистанция между донора (QD) и акцептора (Cy5) в рамките на Фьорстеровия радиус (под 10 nm). При повечето

FRET-двойки, дистанция от 4.5-5.5 nm между донора и акцептора гарантира 50% ефективност на FRET, като тази ефективност намалява синусоидално с увеличаване на дистанцията [Medintz et al., 2003a, 2005]. В нашия случай, експериментално намерената ефективност на FRET (по уравнението:  $E=1 - F_{DA}/F_D$ ; където  $F_{DA}$  и  $F_D$  са съответно флуоресценцията на донора в присъствие и отсъствие на акцептор) беше ~35-40%.

\* \* \*

В заключение, разработеният от нас FRET-анализ на базата на QD-белязана „хибридизационна проба” (QD-siRNA) и Cy5-белязан „хибридизационен образец” (Cy5-mRNA) се характеризираше с висока чувствителност и специфичност. Анализът е сравнително бърз и би могъл да се използва за експериментален скрининг на siRNA секвенции с висок афинитет към таргетната mRNA, които биха били подходящи за ефективна регулация на експресията на таргетния ген. Добрата корелация между амплитудата на FRET сигнала и специфичния антисенс ефект на siRNA дават основание да се предполага, че методът би могъл да се използва и за прогнозиране на ефективността на siRNA секвенциите по отношение на регулацията на генната експресия, преди да бъдат трансфектирани в клетки и анализирани със стандартните молекулярно-биологични тестове. QD-белязаните хибридизационни проби са подходящи и за валидиране на данните от микроарей анализите.

Недостатък на метода е необходимостта от осигуряване на високостерилни условия при работа с РНК и ДНК, което оскъпява разработването на пробите и самите анализи.

Резултатите от изследването бяха публикувани през юли, 2005 в *J. Am. Chem. Soc.*, а методът беше специално отбелязан в web-страницата на National Institute of Health (US) през август, 2005.

#### **IV. Приложение на таргет-специфични QD-проби за биомедицински анализи с флуоресцентна детекция *in vivo***

Едно от най-атраktivните свойства на QD е потенциалът им за разширяване на възможностите на флуоресцентните имиджинг анализи *in vivo*. Високият квантов добив (над 50%) и голямото Стоксово отместване между дължината на вълната на възбуждане и максимума на емисия (което може да достигне 300 nm и повече) позволяват да се сведе до минимум автофлуоресценцията на живите тъкани, особено при използването на QD, флуоресциращи в дълговълновата област на видимия диапазон и инфрачервената област. Високият интензитет на дву-фотон възбудената флуоресценция на QD, както и възможностите за забавена във времето детекция на флуоресцентната емисия биха повишили допълнително съотношението сигнал/фон. Това дава възможност с QD да бъдат визуализирани комплексни структури, клетки и дори молекулни таргети на значително по-голяма дълбочина от повърхността на тялото, в сравнение с тази, която се постига при конвенционалните органични флуорофори. QD разкриват и още една възможност – за разработване на бимодални и мултимодални проби за приложение в две и повече техники за визуализиране.

Флуоресцентният имиджинг има огромен потенциал в експерименталната медицина, тъй като съчетава висока чувствителност с висока резолюция – комбинация, която не се наблюдава при другите техники за образна диагностика като PET, MRI и EPR имиджинга. Флуоресцентните имиджинг анализи се използват експериментално при изследване на фармакодинамиката на лекарствените средства, тяхната локализация и степен на акумулиране в тъканите, за детекция на експресията на рецептори и маркери за редица заболявания, за визуализиране и диагностика на съдови увреждания и др. [Andersson-Engels et al., 1997; Wagnieres et al., 1998; Bremer et al., 2003; Bentolila et al., 2009; Leblond et al., 2009; Mulder et al., 2009].

При разработването на QD-проби за *in vivo* имиджинг анализи следва да се спазват няколко правила [Bakalova



et al., 2007b], най-съществените от които са: (i) капсулирането на QD в биоинертни и биопоносими обвивки с оглед на изолирането на кристалното ядро от околната среда и свеждане до минимум на неговата токсичност; (ii) конюгирането на капсулираните QD с биопоносими субстанции (най-често биопоносими полимери), намаляващи скоростта на тяхното натрупване в черния дроб и слезката и повишаващи времето на полуживот на наночастиците в кръвообръщението. Това подпомага и улеснява достъпът до съответния таргет и неговото визуализиране, прави наночастиците инертни по отношение на имунната система и предотвратява евентуални процеси на опсонизация и индуциране на неспецифичен имунен отговор [Romberg et al., 2008]. Тези биоинертни полимери дават и други предимства на наночастиците освен гореизброените. Те подпомагат също извеждането на наночастиците от организма – например, чрез ренална филтрация, като повишават допълнително тяхната водоразтворимост и намаляват токсичността им [Hagens et al., 2007; Longmire et al., 2008].

Идеята за капсулиране на наночастици в биопоносими органични обвивки и тяхното конюгиране с биопоносими полимери възниква в средата на 90-те години във връзка с разработването на водоразтворими феромагнитни наночастици за биоанализи [Allermann et al., 1995; Leroux et al., 1995]. Изхожда се от натрупания вече опит в синтезата на биопоносими полимери за капсулиране и доставка на лекарствени средства [Heller, 1980; Buckles, 1983; Laurencin et al., 1990; Langer & Moses, 1991].

Един от най-ранните и най-често използваните биопоносими полимери за опаковане на наночастици са полиетиленгликолят (PEG) и декстранът, както и силиконовите/силикагелните обвивки [Allermann et al., 1995; Leroux et al., 1995]. По-късно в практиката се налагат и биопоносимите дендримери и диблок/триблок кополимерите [Sidorov et al., 1999; Crooks et al., 2001]. Декстранът и PEG не само правят наночастиците хидрофилни, но и повишават времето им на полуживот в циркулацията. Наблюдавано е, обаче, че в някои случаи декстранът индуцира остри имунни реакции (като анафилаксия) [van der Klauw et al., 1996]. Това прави PEG и до днес най-често използваният полимерен материал за стабилизиране на наночастици и за удължаване на техния престой в кръвния ток [Otsuka et al., 2003]. По-дългото време на полуживот на PEG-илираните наночастици в циркулацията се дължи на т.нар. „стеричен стабилизиращ ефект” на полимера. Молекулите на PEG формират защитен хидрофилен слой на повърхността на наночастиците, което пречатства тяхното взаимодействие с кръвните субстанции, например с макрофагите, което от своя страна забавя значително акумулирането им в черния дроб и слезката [Romberg et al., 2008]. Това е изключително важно условие при разработването на контрастни биопоносими наночастици за образна диагностика, тъй като дава възможност за по-дълго време на скениране, откриване и прецизно локализиране и визуализиране на интересувания ни таргет (клетки, тъкани или експресия на молекули и рецептори). Известни са и редица други полимери, притежаващи „стеричен стабилизиращ ефект” върху наночастиците: поли(оксазолин), поли(глицерол), поли-N-винилпиролон и др. [Torchilin et al., 1995; Woodle, 1998; Torchilin, 2006].

Освен конюгирането с PEG, функционализираната повърхност на QD позволява конюгиране и с други лиганди, което ги прави подходяща матрица за разработването на мултимодални проби за образна диагностика. Например, на повърхността на PEG-илираните QD могат да бъдат конюгирани хелатори за парамагнитни йони и радионуклиди, което позволява разработването на би- и мултимодални проби за едновременно прилагане в няколко техники за визуализиране (например, флуоресцентно визуализиране, MRI, PET и др.).

От 2003 година досега водоразтворимите QD са намерили приложение за визуализиране на кръвоносни съдове и „пасивен” и „активен” таргетинг на различни тъканни и клетъчни структури *in vivo*, свързан предимно с визуализирането на тумори в експериментални животни с помощта на флуоресцентна микроскопия,

флуоресцентен имиджинг анализ и MRI [Larson et al., 2003; Ballou et al., 2004, 2005; Sathe et al., 2006; Jayagopal et al., 2007; Li et al., 2007; Smith et al., 2007; Cai & Chen, 2008a; Gonda et al., 2010; Lei et al., 2009; Zerda et al., 2009; Zintchenko et al., 2009]. Нашият колектив също има значителен принос в тези приложни изследвания. Усилията ни бяха насочени към разработването на QD-проби за флуоресцентен и мултимодален имиджинг анализ *in vivo* на базата на опаковани или капсулирани в биопоносими обвивки (силика-шел и дендримери) QD CdSe/ZnS, конюгирани с PEG, антитела и хелатори за парамагнитни йони (вж. раздел II на *Експериментални резултати*). *In vivo* анализите се свеждаха до: (i) прилагане на мономодални QD-проби за визуализиране на мозъчната циркулация, с оглед на изследване на връзката между церебралния кръвен ток и нервната активност, което изисква визуализиране на капилярната мрежа (съдове с диаметър 5-10  $\mu\text{m}$ ), разположена на дълбочина по-голяма от 300  $\mu\text{m}$  от повърхността на мозъчната кора; за целта беше използвана дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия; и (ii) прилагане на мултимодални QD-проби за визуализиране на тумори в експериментални животни с помощта на флуоресцентен имиджинг и MRI. Експерименталните резултати от тези изследвания са описани по-долу.

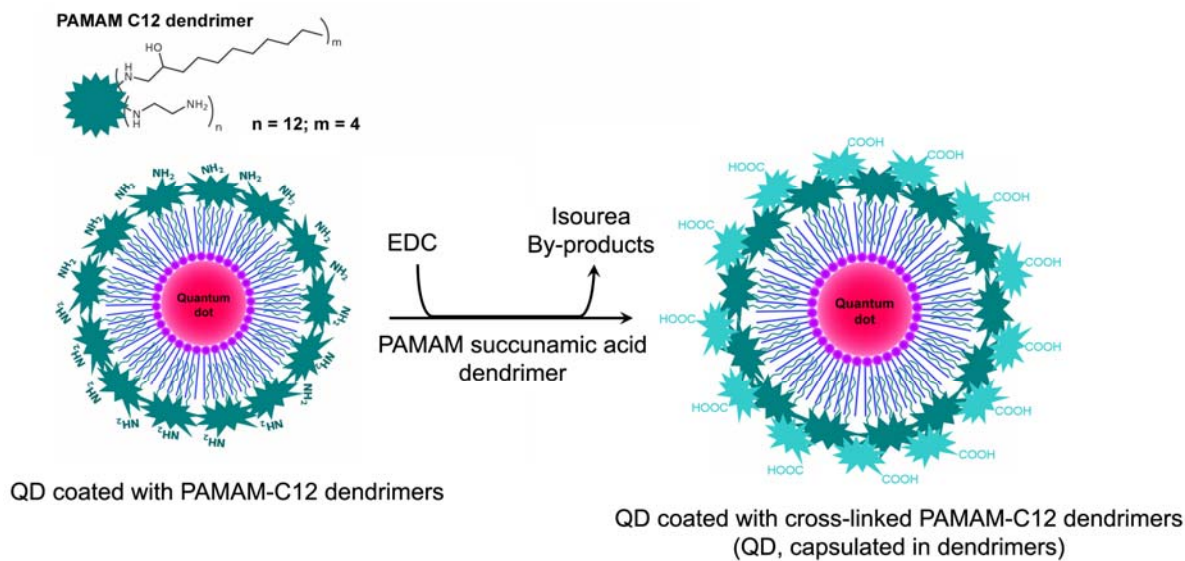
### **1. Изследване на ефектите на капсулирането и функционализацията на обвити в дендримери QD при визуализиране на кръвоносни съдове в мозъка на експериментални животни с дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия**

Тази серия експерименти демонстрира значението на вида и структурата на органичната обвивка на QD-пробите за обезпечаване на ниската им токсичност и свеждане до минимум на страничните ефекти при въвеждането им в живия организъм.

В експериментите използвахме два вида QD-проби, разработени на базата на обвити в дендримери наночастици CdSe/ZnS (**Схема 6**). В първата проба QD са обвити в неомрежени катионни PAMAM C12 дендримери (втора генерация). Хидрофобните въгледородни вериги на дендримера взаимодействат с координационните лиганди от повърхността на нанокристалата чрез хидрофобни взаимодействия. Повърхността на наночастиците е аминоксидно-функционализирана и положително заредена при физиологични стойности на рН.

Втората QD-проба получавахме от първата, като капсулирахме наночастиците чрез омрежване на повърхностните аминоксидно-групи на PAMAM дендримерите с карбокси-функционализираните дендримери с формиране на амидна връзка между двете функционални групи (**Схема 6**). Капсулиращите дендримери обвиват цялостно структурата и променят характера на нейната повърхност. Така повърхността на наночастиците вече е карбокси-функционализирана и отрицателно заредена.

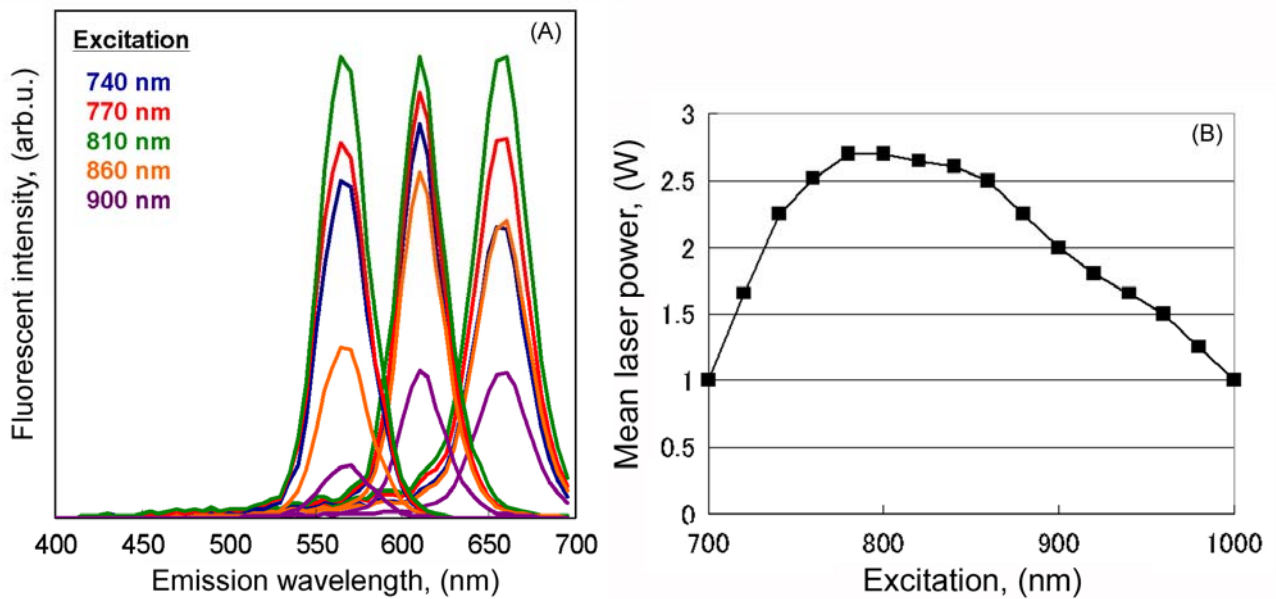
Дзета-потенциалът на аминоксидно-функционализираните наночастици беше около +7.0 mV при рН 7.4, а на карбокси-функционализираните – около -18.7 mV при рН 7.4 (измерен в PBS).



**Scheme 6.** Model structure of QD-probes, consisting of CdSe/ZnS QDs coated by non-cross-linked or capsulated in cross-linked PAMAM dendrimers.

И двете QD-проби се характеризираха с висока разтворимост и колоидна стабилност във водни разтвори (ниско- и високосолеви). Пробите бяха приложени за флуоресцентно визуализиране на мозъчната циркулация в експериментални животни под анестезия с използване на дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия.

На **Фигура 24А** са представени дву-фотон възбудените емисионни спектри на три различни по размер и флуоресцентна емисия QD, обвити в дендримери. Най-висок е интензитетът на дву-фотон възбудената флуоресценция при  $\lambda_{ex}=810$  nm. В диапазона 780-840 nm източникът на възбуждане се характеризира и с най-висока средна мощност (~2.5-2.7W) (Фигура 24В). Във всички последващи експерименти с дву-фотон възбудена флуоресценция, описани в следващите раздели, са използвани следните условия на детекция: възбуждане на 810 nm и емисия на 565, 605 или 655 nm, в зависимост от размера на кристалните ядра на QD, обвити в дендримери или в други обвивки (напр., силика-шел).



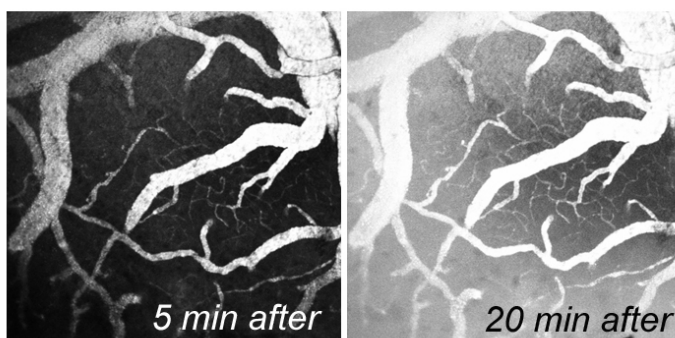
**Figure 24.** (A) Two-photon-excited fluorescence of QD<sup>565</sup>, QD<sup>605</sup> and QD<sup>655</sup>, dissolved in PBS (20 pM) at different excitation wavelengths. The spectra are representative for all organic-coated QD, used in the studies with two-photon excited fluorescence. (B) Variations in the mean laser power at different two-photon excitation wavelengths.

Confocal microscope system (TCS SP5, Leica Microsystems) supplied with Ti:Sapphire pulsed laser (700 – 1000 nm, MaiTai HP, Spectral physics) was used. Detectors: filter/band-pass: #1. 525/50 nm & 610/75 nm, (via 560/10 nm beam-splitter); #2. 565/50 nm & 655/50 nm, (via 610/10 nm beam-splitter); photomultiplier tubes: R6357-option (Hamamatsu).

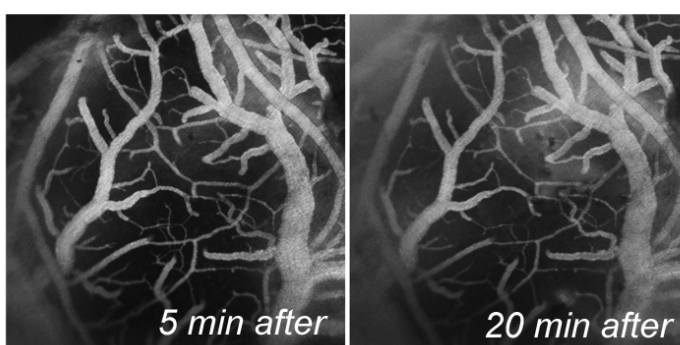
На **Фигура 25** са представени резултати от флуоресцентното визуализиране на кръвоносните съдове в мозъка на плъх след интравенозното инжектиране на обвити в дендримери QD<sup>525</sup>. Изображенията са получени с дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия при  $\lambda_{ex} = 810$  nm, емисионен филтър 525 $\pm$ 50 nm, в хоризонтален план на скениране на дълбочина 150  $\mu$ m от повърхността на мозъчната кора. При инжектиране на обвити в неомрежени дендримери QD се наблюдава помътняване на зрителното поле с времето на детекция и затрудняване на измерването на средния диаметър на визуализираните артериоли и венули (Фигура 25A). Концентрацията на инжектираната проба е 0.3 nmol QD/kg b.w. Повишаването на концентрацията на обвитите в неомрежени дендримери QD водеше до невъзможност за визуализиране на малките кръвоносни съдове (венули и артериоли), както и за ясно отдиференциране на очертанията и структурата на големите кръвоносни съдове (вени и артерии). Интравенозното инжектиране на QD-пробата водеше до промяна и на основните физиологични параметри на животното. Кръвното налягане и сърдечният ритъм намаляваха, което беше съпроводено от вазодилатация на съдовете (**Таблица 4**).

При инжектиране на капсулирани в омрежени дендримери QD (0.3 nmol/kg b.w.) не се наблюдава помътняване на зрителното поле и съществено изменение на флуоресцентното изображение с времето на детекция (Фигура 25B). Кръвоносните съдове са ясно очертани и получените изображения позволяват оценка на структурата и измерване на средния им диаметър. Тази QD-проба не предизвиква промени в кръвното налягане, сърдечния ритъм и размера на кръвоносните съдове до 20 min след инжектирането ѝ в организма (**Таблица 5**).

(A) CdSe/ZnS QD, capsulated in PAMAM dendrimers (0.3 nmol/kg b.w.)



(B) CdSe/ZnS QD, capsulated in cross-linked dendrimers (0.3 nmol/kg b.w.)



**Figure 25.** Two-photon excited fluorescent images of brain vasculature of anesthetized rat in horizontal planes (at 150  $\mu\text{m}$  depth from the brain surface) after i.v. injection of QD525, capsulated in non-cross-linked (A) or cross-linked dendrimers (B). All images were obtained at  $\lambda_{\text{ex}} = 810 \text{ nm}$ . Detectors: filter/band-pass: 525/50 nm, (via 560/10 nm beam-splitter).

**Table 4.** Physiological characteristics before and after i.v. injection of QDs (coated in non-cross-linked PAMAM dendrimers) in experimental animals under anesthesia.

Parameters	Before injection	~20 min after injection	P value
Mean Arterial Blood Pressure, (mmHg)	102.5 +/- 2.5	75.5 +/- 7.1	<0.05
Heart rate, (BMP)	378 +/- 29	310 +/- 15	<0.05
Mean diameter of detected arteries, ( $\mu\text{m}$ )	28 +/- 9	35 +/- 10 (vasodilation)	<0.05
Mean diameter of detected veins, ( $\mu\text{m}$ )	42 +/- 23	45 +/- 18 (vasodilation)	ns

Mean +/- SD from six independent experiments. QD concentration – 300 pmol/kg b.w.

**Table 5.** Physiological characteristics before and after i.v. injection of QDs (capsulated in cross-linked PAMAM dendrimers) in experimental animals under anesthesia.

Parameters	Before injection	~20 min after injection	P value
Mean Arterial Blood Pressure, (mmHg)	96.8 +/- 4.9	100.5 +/- 8.4	ns
Heart rate, (BMP)	340 +/- 21	336 +/- 23	ns
Mean diameter of detected arteries, ( $\mu\text{m}$ )	23 +/- 10	Constant	ns
Mean diameter of detected veins, ( $\mu\text{m}$ )	41 +/- 20	Constant	ns

Mean +/- SD from six independent experiments. QD concentration – 300 pmol/kg b.w.

Представените по-горе експериментални резултати показват, че обвитите в неомрежени PAMAM дендримери QD индуцират странични ефекти при използването им *in vivo* и не са подходяща флуоресцентна проба за визуализиране на мозъчната циркулация и процесите, свързани с нея. Помътняването на зрителното поле след инжектирането на пробата може да се обясни с нейния трансепителиален и трансендотелиален транспорт и проникването ѝ в тъканите. [Kitchens et al. \(2005\)](#) са показали, че катионните PAMAM дендримери (от нулева до четвърта генерация) са изключително проницаеми за епителните и ендотелните клетки и проникват лесно и бързо през кръвоносните съдове. Това свойство на PAMAM дендримерите се използва широко при разработването на нови преносители на лекарствени средства [[Medina & El-Sayed, 2009](#); [Nanjwade et al., 2009](#); [Paleos et al., 2009](#); [Samad et al., 2009](#)]. Показано е също, че катионните PAMAM дендримери проникват през стените на аортата.

Капсулираните в дендримери карбокси-функционализирани QD бяха също допълнително пегилирани с PEG1100. Измерването на промяната на интензитета на флуоресценцията с времето в определена зона на големите кръвоносни съдове е показателно за времето на полуживот на пробата в циркулацията. Беше установено, че PEG-илирането не променя съществено времето на полуживот на пробата в мозъчната циркулация –  $\tau_{1/2}$  на не-PEG-илираните QD беше  $\sim 65$  min, а на PEG-илираните с PEG1100 – около 70 min.

В хода на работата установихме също, че обвитите в неомрежени PAMAM дендримери QD (в концентрации над 50 nM) индуцират цитотоксичност в култивирани клетъчни линии ([Таблица 6](#)), докато капсулираните и карбокси-функционализирани (а също и PEG-илирани) QD не проявяват цитотоксичност в концентрационния диапазон 10-500 nM. Ясноизразената цитотоксичност на QD, обвити в неомрежени PAMAM дендримери, може да се обясни с ниската стабилност на дендримерната обвивка тип „мицел” (при тази обвивка структурата се държи основно на по-слабите хидрофобни взаимодействия) и частичното ѝ разграждане и освобождаване на цитотоксични мономери в около- и вътреклетъчното пространство. Редица колективи са показали, че катионните PAMAM дендримери са цитотоксични [[Kolhatkar et al., 2007](#); [Nam et al., 2008](#); [Thomas et al., 2009](#); [Wang et al., 2009a,b](#); [Yellepeddi et al., 2009](#)].

Органичната обвивка тип „мицел” е лабилна като структура и може да се разгради лесно и бързо както в условия *in vitro*, така и в условия *in vivo*. Наличието на свободни PAMAM дендримери в кръвния ток би могло да обясни и страничните ефекти на QD-пробата върху физиологичните параметри, наблюдавани в настоящото изследване ([Таблицы 4 и 5](#)). Показано е, че катионните PAMAM дендримери повишават освобождаването на азотен оксид – един от основните медиатори, отговорни за вазодилатацията на кръвоносните съдове [[Stanko & Schoenfisch, 2006](#)], докато анионните (PAMAM-COOH) дендримери редуцират значително този процес [[Wang et al., 2009a](#)]. Тези изследвания биха могли да обяснят, поне отчасти, наблюдаваната от нас вазодилатация на венулите и артериолите при инжектиране на QD, обвити в неомрежени дендримери ([Таблица 4](#)), и отсъствие на вазодилатация при инжектиране на QD, капсулирани в омрежени дендримери ([Таблица 5](#)).

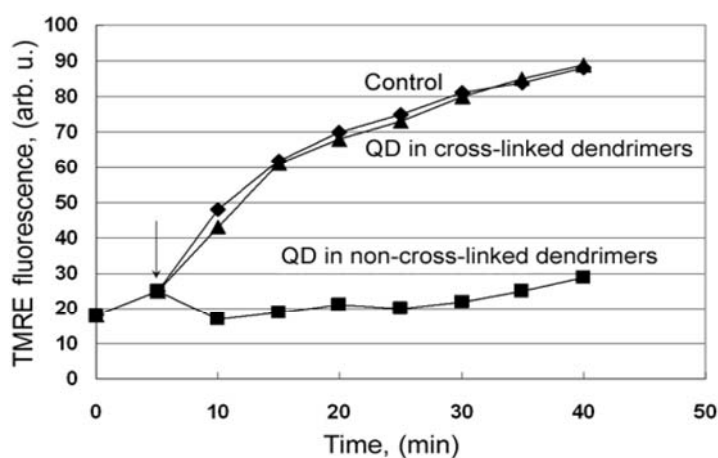
**Table 6.** Cytotoxicity (% from control) of CdSe/ZnS QD, coated with non-cross-linked PAMAM dendrimers (flow cytometric assay).

Cell line	10 nM QD	50 nM QD	100 nM QD	200 nM QD	500 nM QD
Jurkat	99 +/- 7	97 +/- 5	62 +/- 5	30 +/- 7	21 +/- 4
K562	101 +/- 6	98 +/- 9	62 +/- 9	37 +/- 5	16 +/- 3
A549	103 +/- 9	101 +/- 5	65 +/- 7	39 +/- 5	28 +/- 5
HeLa	99 +/- 3	100 +/- 5	60 +/- 8	32 +/- 3	20 +/- 4

The cell viability in absence of QD (control) was considered 100%. The data are mean +/- SD from six independent experiments.

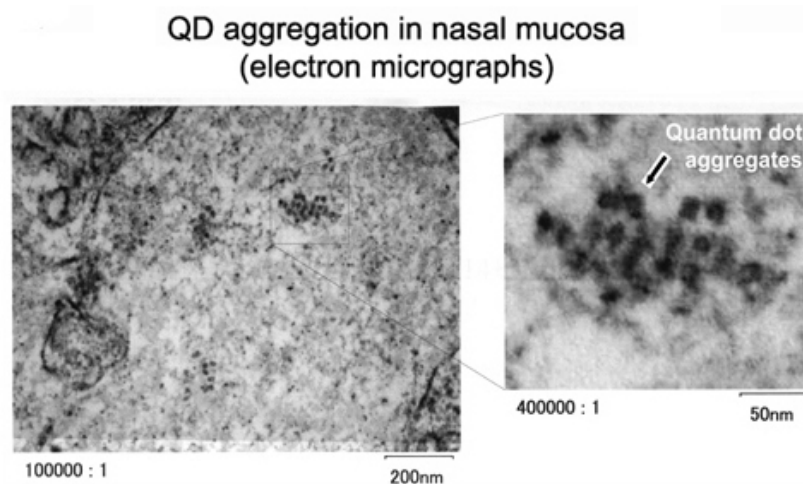
Тъй като цитотоксичността на дендримерите се свързва преди всичко с тяхната висока проникваемост за клетъчните мембрани и колокализацията им в митохондрии и лизозомите [Lee et al., 2009; Saovapakhiran et al., 2009; Thomas et al., 2009], в серия експерименти изследвахме влиянието на обвити в неомрежени PAMAM дендримери CdSe/ZnS QD върху митохондриалния потенциал ( $\Delta\Psi_m$ ) – един от най-показателните фактори за индукция на апоптоза в живите клетки. За сравнение използвахме капсулирани в омержени (карбокسي-функционализирани) дендримери и PEG-илирани QD (Фигура 26).

За детекция на мембрания потенциал на митохондрии използвахме същата по структура QD-проба, но с емисионен максимум на 485 nm и тетраметилродамин-етилов естер (TMRE с максимум на емисия 575 nm) – органичен флуорофор, чиято флуоресценция се променя пропорционално на митохондриалния потенциал. Загубата на митохондриалния потенциал е показател за индукция на апоптоза в клетките и е съпроводена от намаляване или пълна загуба на флуоресценцията на TMRE [Wong & Cortopassi, 2002]. Резултатите на Фигура 26 показват, че обвитите в неомрежени PAMAM дендримери QD водят до деполяризация на митохондриалната мембрана и загуба на мембрания потенциал, докато капсулираните в омержени дендримери и PEG-илирани QD не повлияват митохондриалния потенциал на клетките. Общоприето е схващането, че загубата на митохондриалния потенциал води до експресия на цитохром С и Araf-1 (apoptotic peptidase activating factor 1) и активиране на каспазите, което от своя страна води до апоптоза и клетъчна смърт [Adams & Cory, 2002; Anichini et al., 2006; Caroppi et al., 2009]. Този механизъм би могъл да обясни цитотоксичния ефект на обвитите в неомрежени PAMAM дендримери QD.

**Figure 26.** Dynamics of TRME fluorescence of Jurkat cells in the absence (control) or in the presence of dendrimer-coated CdSe/ZnS QDs (100 nM).

## 2. Визуализиране на кръвоносни съдове в мозъка на експериментални животни с дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия и капсулирани в силика-шел и PEG-илирани QD

Силикагелните и силиконовите материали се считат за едни от най-биоинертните и биопоносими материали за опаковане на наночастици. Показано е, че малките силика-наночастици (под 50 nm в диаметър) не активират макрофагите [Choi et al., 2007c; Cho et al., 2009; Waters et al., 2009] и не би следвало да предизвикват имунен отговор при интравенозното им въвеждане в организма. Силика-обвивките, обаче, не осигуряват достатъчно висока разтворимост на QD във високосолеви разтвори, каквито са физиологичните разтвори и телесните течности [Dubertret et al., 2002]. В раздел II.1. на *Експериментални резултати* беше посочено, че QD CdSe/ZnS, капсулирани в силика-шел и amino-функционализирани, но не-PEG-илирани, агрегират във високосолеви буферни разтвори, което го прави неподходяща проба за *in vivo* имиджинг анализи. При интраназалната инокулация на тези наночастици в мишки наблюдавахме множество агрегати в назалната мукоза (**Фигура 27**).



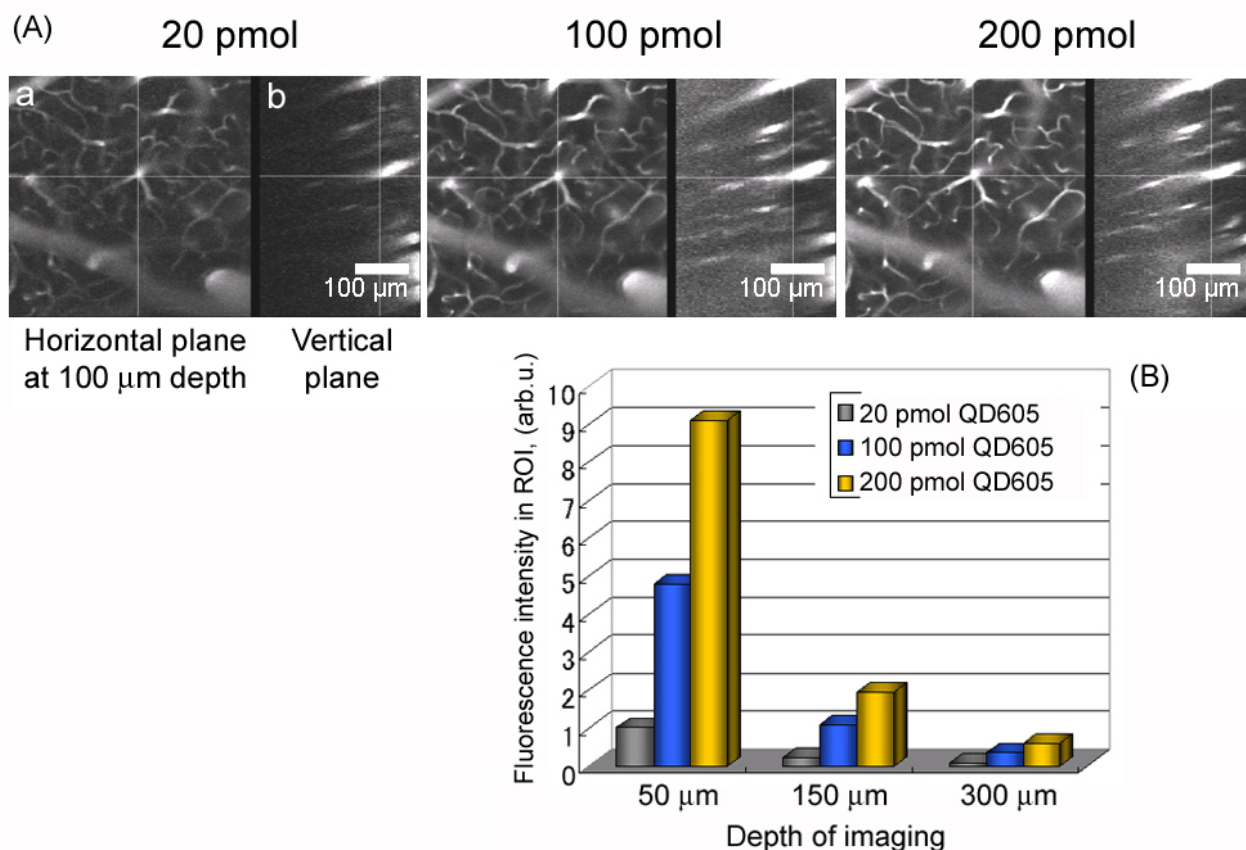
**Figure 27.** Electron micrographs of nasal mucosa 1 day after intranasal inoculation of amino-functionalized silica-shelled QDs (dissolved in distilled water; 30 drops per animal; single dose).

Ниската разтворимост на капсулираните в силика-шел QD във високосолеви разтвори доведе до необходимостта от конюгиране на силика-сферите с PEG за тяхното стабилизиране (повишаване на водоразтворимостта им), преди пробата да бъде приложена за имиджинг анализи *in vivo*. За целта беше използван PEG със средна молекулна маса ~400 Da, ~600 Da или ~1100 Da, означен по-долу като PEG400, PEG600 и PEG1100. PEG-илираните силика-наночастици бяха с висока колоидна стабилност във физиологични разтвори (например, в 100 mM PBS не се наблюдаваше агрегация на наночастиците)(вж. раздел II.1. на *Експериментални резултати*). Опакованите в силика-шел и PEG-илирани QD не проявяваха цитотоксичност в концентрации от 10 до 500 nM. Тестовите за цитотоксичност бяха проведени върху няколко туморни клетъчни линии *in vitro*.

**Фигура 28А** представя дву-фотон възбудени флуоресцентни микроскопски изображения на кръвоносни съдове в мозъка на плъх (под анестезия), след интравенозно инжектиране на PEG1100-конюгирани QD<sup>605</sup> в нарастваща концентрация на пробата (от 20 до 200 pmol на животно, съответстващи на 0.1-1 nmol/kg b.w.). Изображенията са регистрирани в хоризонтален (на дълбочина 100  $\mu\text{m}$ ) и вертикален план (до 300  $\mu\text{m}$  под мозъчната кора). Вижда се, че тази QD-проба дава ясна картина на кръвоносната мрежа в мозъка дори при



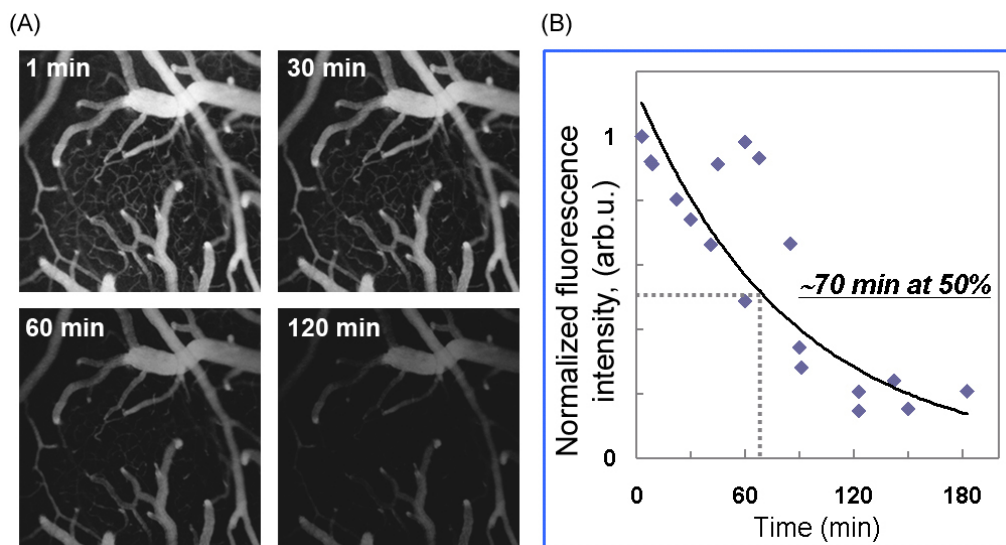
сравнително висока концентрация на наночастиците – 1 pmol/kg b.w. От друга страна концентрация от 0.1 pmol QD<sup>605</sup>/kg b.w. е достатъчна за визуализиране на големите и средни по размер кръвоносни съдове на дълбочина до 100  $\mu\text{m}$  при възбуждане на 810 nm. С повишаване на концентрацията на QD-пробата се повишава контрастът на флуоресцентните изображения в хоризонтален план (Фигура 28А), както и дълбочината, при която могат да бъдат визуализирани кръвоносните съдове, като се достига дълбочина от 300  $\mu\text{m}$  при инжектиране на 200 pmol QD<sup>605</sup>, конюгирани с PEG1100.



**Figure 28.** (A) Dose-dependent contrast of brain vasculature in horizontal (at 100  $\mu\text{m}$  depth) and vertical plane after intravenous injection of PEG1100-grafted QD<sup>605</sup> (200  $\mu\text{L}$  of 0.1, 0.5 or 1  $\mu\text{M}$  dissolved in PBS) in anesthetized rats (mean body weight  $\sim$ 200 g). The images (two-photon excited fluorescence) were obtained 5 min after QD injection at  $\lambda_{\text{ex}} = 810$  nm and laser power  $\sim$ 2.7 W. Emission filter: 610 $\pm$ 10 nm. Images from one representative experiment are shown in the figure. (B) Fluorescence intensity at different depth from the brain surface. The data were normalized against the ROI image, obtained at 50  $\mu\text{m}$  depth after injection of 200 pmol PEG1100-grafted QD<sup>605</sup>. The fluorescence intensity of this image was considered 1 arb.u. Mean data from three animals are shown in the diagram (SD did not exceed 20%).

Интензитетът на дву-фотон възбудената флуоресценция на QD в мозъчната циркулация намалява експоненциално с времето (Фигура 29В). Времето на полуживот на флуоресценцията на QD в мозъчните кръвоносни съдове зависи от молекулната маса на PEG и варира в интервала 70-120 min (трябва да се уточни, че тези стойности са измерени на плъхове със средно тегло 200 g) (Фигура 29С). PEG1100 се оказва най-добрият вариант, който осигурява достатъчно дълго време на живот на QD в кръвния ток, без да се повишава чувствително размерът на наночастиците. Средният диаметър на PEG-илираните с PEG1100 силика-сфери би

следвало да бъде около или под 20 nm. Всички последващи експерименти *in vivo* с използване на дву-фотон възбудена флуоресценция са проведени с PEG1100-конюгирани QD.

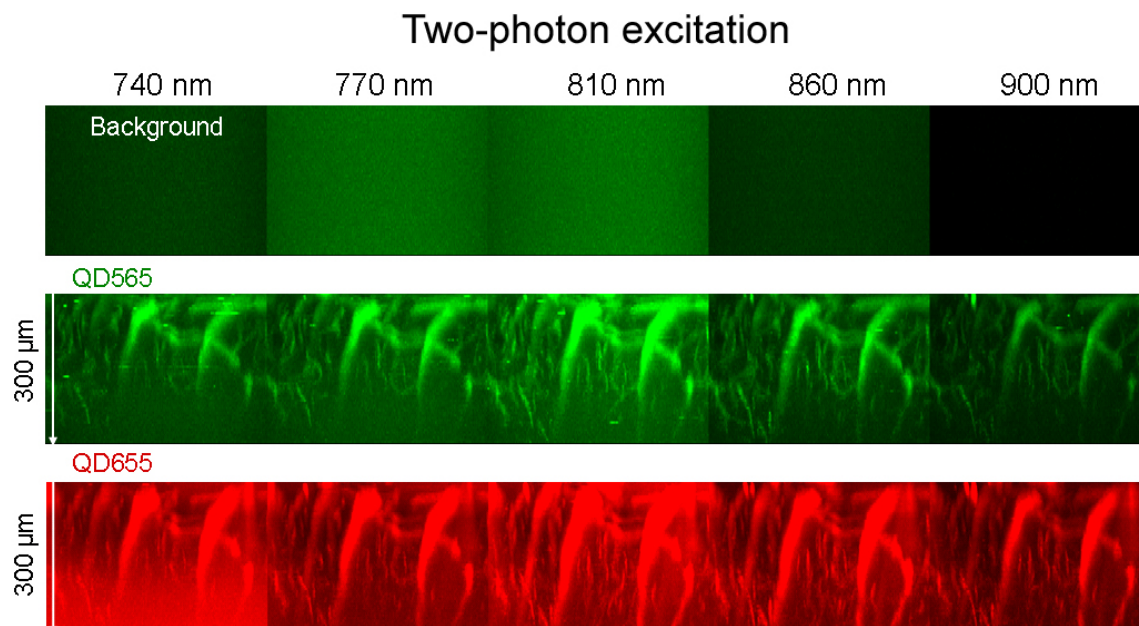


**Figure 29.** (A) Two-photon excited fluorescent images of brain vasculature at 300  $\mu\text{m}$  depth at four different times after i.v. injection of PEG400-grafted QD<sup>605</sup> in rat. (B) Half-life of two-photon excited fluorescence of PEG400-grafted QD<sup>605</sup> in brain vasculature after i.v. injection in anesthetized rat (the data are from 4 animals). (C) Half-life of two-photon excited fluorescence of PEG-grafted QD<sup>565</sup>, QD<sup>605</sup> and QD<sup>655</sup> in brain vasculature after i.v. injection in rat. Injected dose: 500 pmol QD/kg b.w. (single injection). Mean +/- SD from four independent experiments are shown in the table. All data were obtained at  $\lambda_{\text{ex}} = 810$  nm. Detectors: filter/band-pass: #1. 525/50 nm & 610/75 nm, (via 560/10 nm beam-splitter); #2. 565/50 nm & 655/50 nm, (via 610/10 nm beam-splitter).

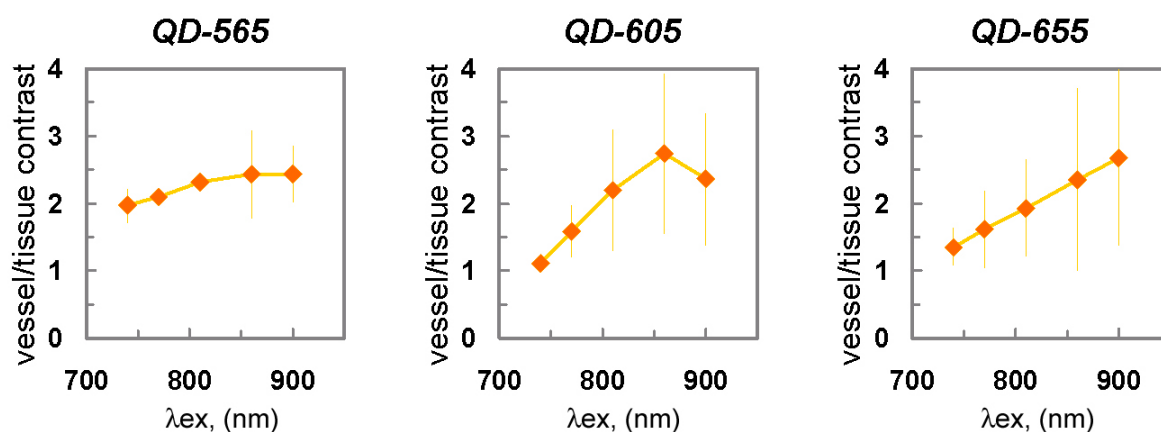
Експоненциалното намаляване на интензитета на дву-фотон възбудената флуоресценция с времето би могло да се отнася до извеждането на QD от кръвообращението и натрупването им в други органи и/или извеждането им от организма, най-вероятно чрез бъбреците [Choi et al. 2007a].

Зависимостта на интензитета на дву-фотон възбудената автофлуоресценция на тъканите и QD-маркираните кръвоносни съдове на мозъка от дължината на вълната на възбуждане в диапазона 740-900 nm е представена на **Фигура 30**. Най-нисък фон (автофлуоресценцията на тъканите и кръвоносните съдове в отсъствие на QD) и най-добър контраст (флуоресценцията на тъканите и кръвоносните съдове след инжектиране на QD) се наблюдава при  $\lambda_{\text{ex}} = 900$  nm, тъй като в този спектрален прозорец живите тъкани се характеризират с най-висока

прозрачност [Pokora, 2004; Gao et al., 2004, 2005; Bashkatov et al., 2005]. Съотношението между интензитета на дву-фотон възбудената флуоресценция на кръвоносния съд към този на тъканта („tissue/vessel contrast”) е показано на **Фигура 31**. Вижда се, че и при трите вида QD контрастът се повишава с нарастване на дължината на вълната на възбуждане в диапазона 740-900 nm, като повишението е най-ясно изразено при QD<sup>655</sup>.



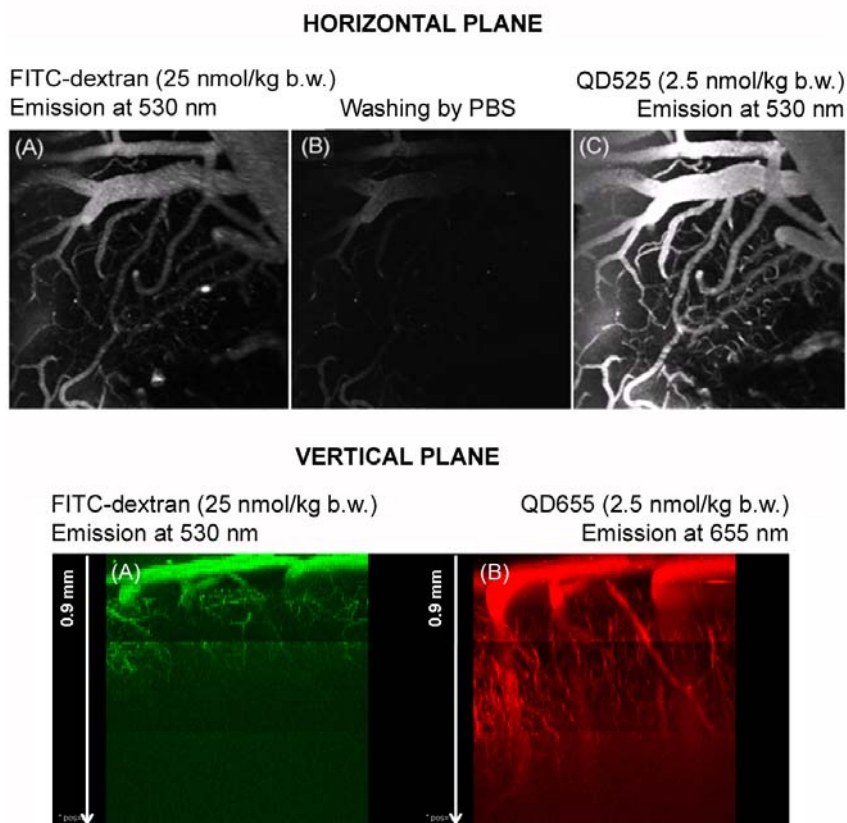
**Figure 30.** Two-photon excited fluorescent images in vertical plane of brain tissue background (in the absence of fluorophore) and brain vasculature (5 min after i.v. injection of PEG1100-grafted QD<sup>565</sup> or QD<sup>655</sup> in anesthetized rat) at different excitation wavelengths. Injected dose: 500 pmol QD/kg b.w. (single injection). Detectors: filter/band-pass: 565/50 nm & 655/50 nm (via 610/10 nm beam-splitter).



**Figure 31.** Tissue-vessel contrast, calculated from the images in horizontal plane, obtained at different excitation wavelengths from 150 μm depth of the brain of anesthetized rats, injected intravenously with PEG1100-grafted QD<sup>565</sup>, QD<sup>605</sup> or QD<sup>655</sup> (500 pmol/kg b.w.). Detectors: filter/band-pass: 525/50 nm, (via 560/10 nm beam-splitter); 565/50 nm & 655/50 nm, (via 610/10 nm beam-splitter). Mean + SD from seven independent experiments are shown in the figure.

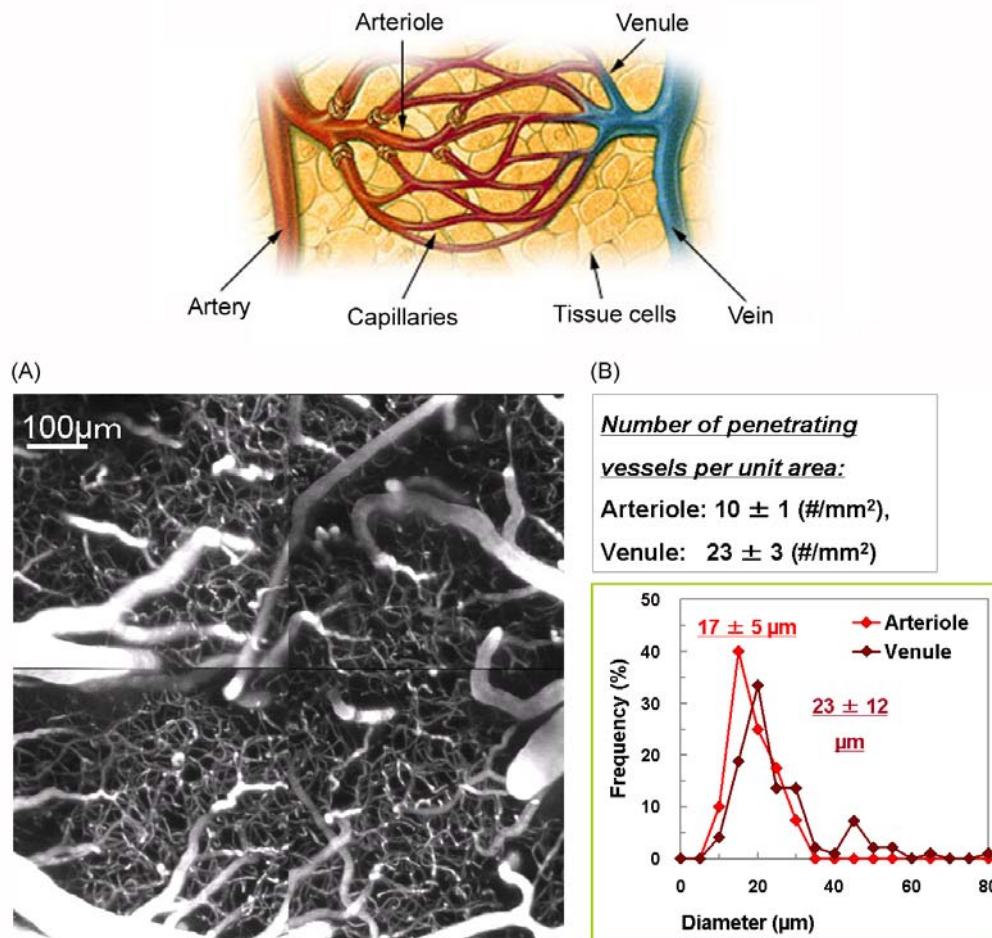
Предимствата на QD пред FITC за флуоресцентния имиджинг *in vivo* са илюстрирани на **Фигура 32**. В хоризонтален план на скениране, PEG1100-QD<sup>525</sup> дава ~8 пъти по-висок интензитет на дву-фотон възбудената флуоресценция при 10 пъти по-ниска моларна концентрация от FITC-декстран (Фигура 32A). Във вертикален план на скениране, PEG1100-QD<sup>655</sup> дава възможност за визуализиране на кръвоносните съдове на дълбочина до 600-750  $\mu\text{m}$ , докато с FITC-декстран се постига визуализиране на дълбочина до 300-350  $\mu\text{m}$  и в този случай моларната концентрация на PEG1100-QD<sup>655</sup> е 10 пъти по-ниска от тази на FITC-декстрана. При подбраните експериментални условия ( $\lambda_{\text{ex}} = 810 \text{ nm}$ ; емисионен филтър 655 $\pm$ 50 nm) PEG1100-QD<sup>655</sup> в концентрация 2.5 nmol/kg b.w. позволява да се визуализират малки кръвоносни съдове с диаметър 10  $\mu\text{m}$ , каквито са капилярите (**Фигура 33**). Повишаването на концентрацията на инжектираната QD-проба води до визуализиране на капиляри с диаметър 5-6  $\mu\text{m}$ .

Представените по-горе резултати демонстрират потенциала на PEG-илираните QD, опаковани в силика-шел, за изучаване на физиологичните процеси в мозъка на голяма дълбочина, като например за изследване на връзката между мозъчната микроциркулация и нервната активност – един от най-интересните физиологични мозъчни феномени, намиращ се в основата на невродегенеративните заболявания. За тази цел, обаче, е необходимо QD-пробата да не повлиява сама по себе си диаметъра на кръвоносните съдове, както и основните физиологични характеристики като кръвно налягане и сърдечен ритъм. Резултатите, представени в **Таблица 7**, показват, че тези параметри са константни в интервал от 20 min след интравенозното инжектиране на QD, капсулирани в силика-шел и конюгирани с PEG1100 (400 nmol/kg b.w.). Подобни резултати бяха получени и на 60-та минута от инжектирането на пробата в плъх.



**Figure 32.** (A) Two-photon excited fluorescent images of brain vasculature in horizontal planes (at 150  $\mu\text{m}$  depth from the brain

surface) after i.v. injection of FITC-dextran (25 nmol/kg b.w.) or PEG1100-grafted QD<sup>525</sup> (2.5 nmol/kg b.w.) in anesthetized rat. (B) Two-photon excited fluorescent images of brain vasculature in vertical planes (up to 900  $\mu\text{m}$  depth from the brain surface) after i.v. injection of FITC-dextran (25 nmol/kg b.w.) or PEG1100-grafted QD<sup>655</sup> (2.5 nmol/kg b.w.) in anesthetized rat. All images were obtained at  $\lambda_{\text{ex}} = 810 \text{ nm}$ . Detectors: filter/band-pass: 525/50 nm, (via 560/10 nm beam-splitter); 655/50 nm, (via 610/10 nm beam-splitter).



**Figure 33.** (A) Two-photon excited 3D reconstructed fluorescent image of a large area of brain microvasculature after i.v. injection of PEG1100-grafted QD<sup>655</sup> (2.5 nmol/kg b.w.) in anesthetized rat.  $\lambda_{\text{ex}} = 810 \text{ nm}$ ; emission filter/band-pass – 655/50 nm. (B) Frequency of large and small blood vessels per unit area. The smallest detectable blood vessel was with diameter 10  $\mu\text{m}$ . Mean data from seven independent experiments are shown in the figure.

**Table 7.** Physiological characteristics before and after i.v. injection of PEG1100-grafted silica-shelled QDs in experimental animals under anesthesia.

Parameters	Before injection	~20 min after injection
Mean Arterial Blood Pressure, (mmHg)	96.8 +/- 5.4	95.3 +/- 12.8
Heart rate, (BMP)	320 +/- 55	345 +/- 51
Mean diameter of arteries, ( $\mu\text{m}$ )	24 +/- 9	Constant
Mean diameter of veins, ( $\mu\text{m}$ )	41 +/- 22	Constant

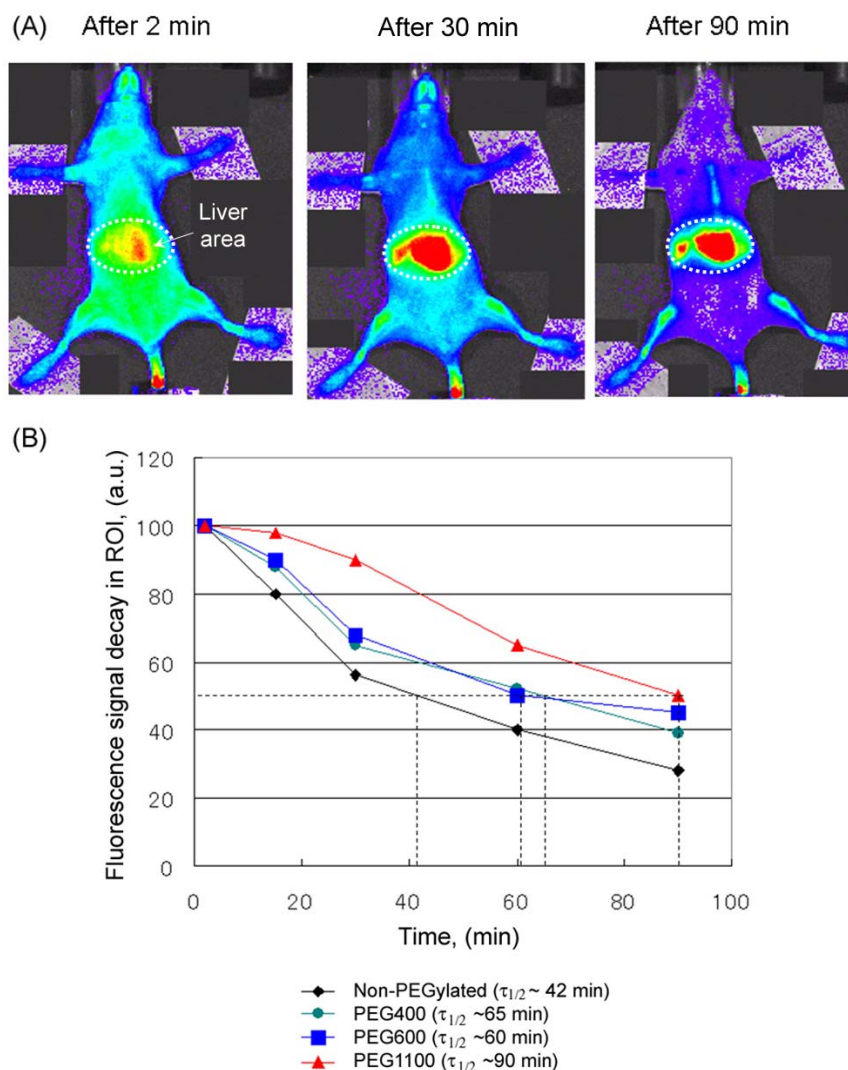
Mean +/- SD from six independent experiments. QD concentration – 400 pmol/kg b.w.

### 3. Визуализиране на тумори в експериментални животни *in vivo* с флуоресцентен имиджинг и MRI, с използване на мултимодални QD-проби

В раздел II.2. на *Експериментални резултати* бяха описани две мултимодални QD-проби, разработени от нашия колектив. Едната от тези проби (Схема 2B) беше приложена за визуализиране на тумори в животни под анестезия (мишки от линията Balb6) с едновременното използване на две имиджинг техники – флуоресцентен имиджинг и MRI.

Фармакодинамиката на капсулираните в силика-шел и PEG-илирани QD, регистрирана с IVIS Imaging System, показва, че PEG1100-QD е възможно най-подходящия вариант от изследваните четири QD-проби, който се характеризира с най-дълго време на полуживот на флуоресценцията на мултимодалните наночастици в циркулацията ( $\tau_{1/2} \sim 90$  min) при сравнително оптимален размер (**Фигура 34**).

От флуоресцентните изображения на Фигура 34 се вижда, че PEG-илираните наночастици се натрупват в зоната на черния дроб в рамките на 90 min от тяхното интравенозно инжектиране. Други автори също са показали, че QD се акумулират предимно в черния дроб, по-малко в слезката, белите дробове и бъбреците, и почти не се откриват в сърцето, мозъка и стомаха [Choi et al., 2007a].

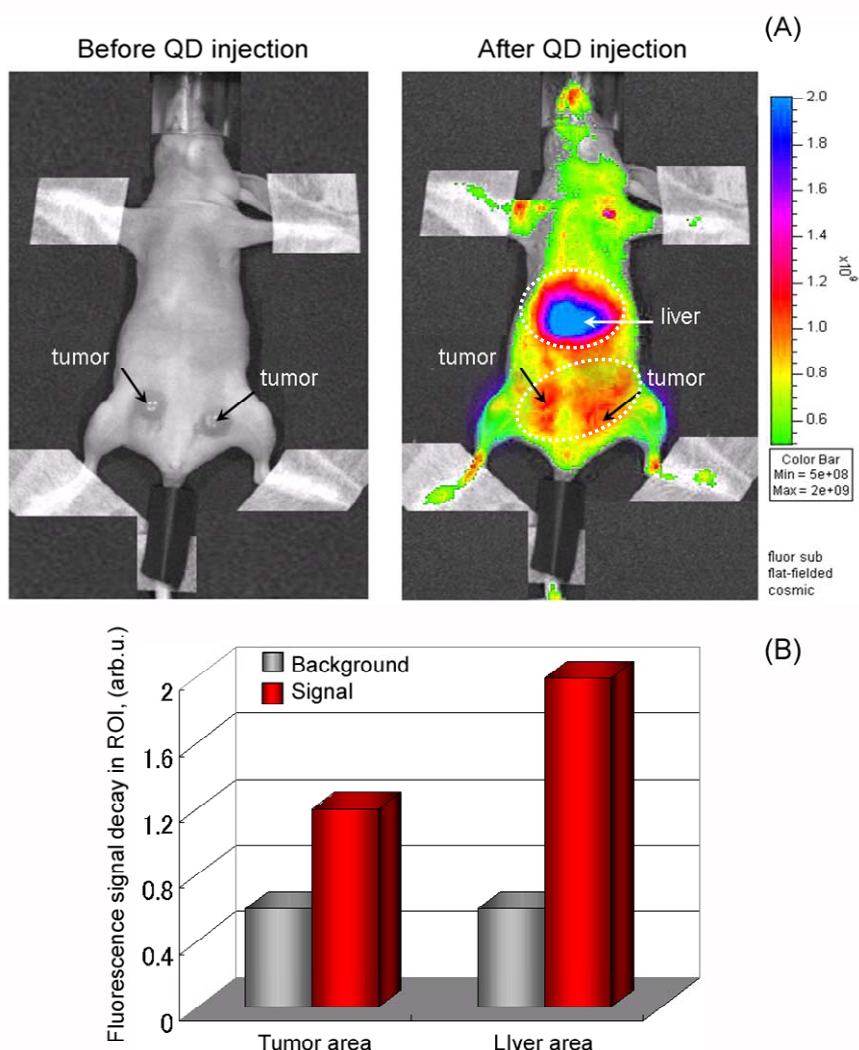


**Figure 34.** (A) Fluorescence imaging of anesthetized mouse, injected intravenously with non-PEGylated multimodal QD<sup>655</sup> (1.6 nmol/kg b.w.; single dose). Arrow indicates liver and heart area. (B) Fluorescence signal decay in ROI (mouse body except liver and

heart area) after intravenous injection of non-PEGylated and PEGylated multimodal QD<sup>655</sup> (1.6 nmol/kg b.w.; single dose). All data were obtained by IVIS Imaging System: excitation at 450±30 nm; emission at 650 nm (DsRed filter). Mean data from six independent experiments are shown in the figure (SD did not exceed 20%).

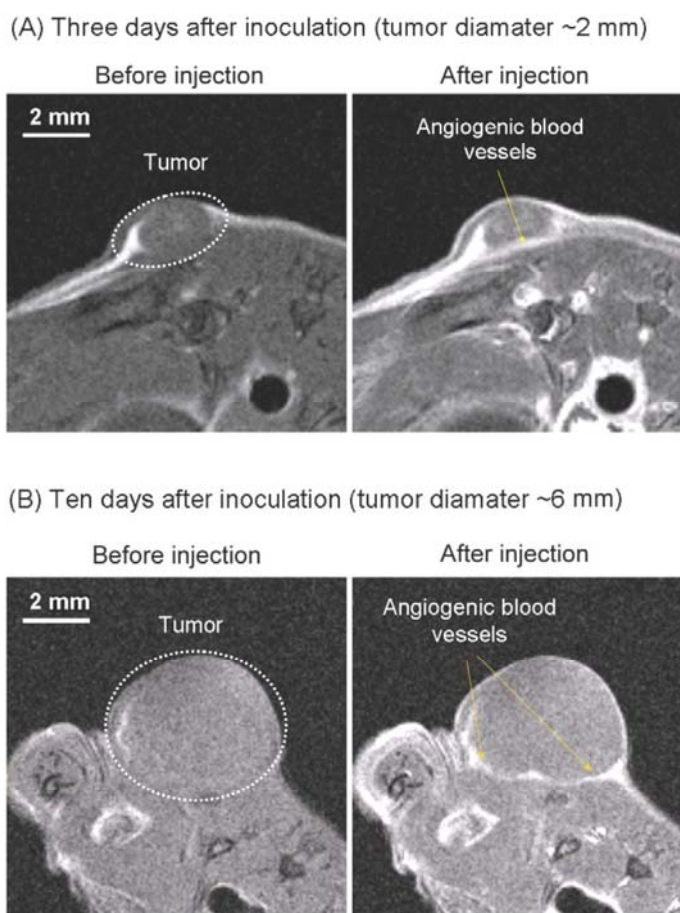
Визуализирането на тумори в мишки, инокулирани с ракови клетки от линията Colon26 е представено на **Фигура 35**. Изображенията са получени на десетия ден от инокулацията. Известно е, че в рамките на десет дни се развива широка мрежа от кръвоносни съдове около този вид тумори, което позволява тяхното визуализиране с помощта на флуоресцентни маркери. Двата тумора се очертават ясно с PEG1100-QD. Интензитетът на флуоресценция в зоната на тумора е ~3 пъти по-висок от този на околните тъкани (Фигура 31В). Най-висок е интензитетът на флуоресценция в зоната на черния дроб (~5 пъти по-висок от този на околните тъкани).

Бимодалните свойства на наночастиците позволяваха визуализирането на тумора и с MRI (**Фигура 36**). Кратките времена на надлъжна релаксация ( $T_1$ ) на гадолиния, разположен върху силика-наносферите, дават възможност туморът да бъде визуализиран още на третия ден от инокулацията, когато размерите му са много малки (до 2 nm в диаметър) и ангиогенната мрежа не е добре развита (Фигура 36А).



**Figure 35.** (A) Fluorescence imaging of tumor angiogenesis in anesthetized mouse, injected intravenously with PEG1100-grafted multimodal QD<sup>655</sup> (1.6 nmol/kg b.w.; single dose). Dashed lines indicate liver area and tumor area (including angiogenic net). The

images were obtained 15 min after injection using IVIS Imaging System: excitation at 450+/-30 nm; emission at 650 nm (DsRed filter). The images were obtained on the 10-th day from cell inoculation ( $1 \times 10^5$  Colon26 cells in 10  $\mu$ L). (B) Fluorescence intensity in tumor area, liver area and other part of the body (background fluorescence) after intravenous injection of PEG1100-grafted multimodal QD<sup>655</sup> (1.6 nmol/kg b.w.; single dose). The data were calculated from the images in (A).



**Figure 36.** T<sub>1</sub>-weighted MR images of colon cancer in anesthetized mouse, injected intravenously with PEG1100-grafted multimodal QD<sup>655</sup> (embedded with gadolinium) (1  $\mu$ mol/kg b.w.; single dose). Dashed lines indicate tumor area (including angiogenic vasculature). The images were obtained immediately after injection, using 7.0 Tesla MRI. Imaging conditions (spin-echo MRI): Echo time – 9.574 ms; Repetition time – 400 ms; Number of averages – 4; Field of view – 32 mm x 32 mm; Matrix size – 256 x 256.

\* \* \*

В заключение, представените в настоящия раздел експериментални резултати показват, че видът и структурата на органичната и биоорганичната обвивка на QD са от изключително значение за тяхната колоидна стабилност (и разтворимост) във високосолеви физиологични разтвори, биопоносимост и свеждане до минимум на цитотоксичността – задължителни условия при прилагането им за *in vivo* имиджинг анализи. Установено е, че QD CdSe/ZnS, капсулирани в омрежена карбокси-функционализирана дендримерна обвивка, са с ниска цитотоксичност и сравнително добра биопоносимост (в концентрации до 0.3 nmol/kg b.w.). Това ги прави подходяща флуоресцентна проба за *in vivo* имиджинг анализи. PEG-илирането на тези наночастици не повишава съществено времето им на полуживот в кръвния ток и не е необходима стъпка при използването им за разработване на QD-проби за *in vivo* имиджинг анализи. PEG-илирането обаче, е задължителна стъпка при



разработването на QD-проби, изходящи от QD, капсулирани в силика-шел. Капсулираните в силика-шел и аминок-функционализирани наночастици са с висока биопоносимост, но с ниска колоидна стабилност във високосолеви физиологични разтвори. Конюгирането на тези наночастици с PEG повишава значително тяхната колоидна стабилност и времето им на полуживот в циркулацията. Като най-подходящ за тази цел беше селектиран PEG1100 (измежду PEG с молекулни маси между 400, 600 и 1100 Da). Конюгирането на наночастиците с PEG1100 им осигурява най-дълго време на живот в циркулацията без да се повишава значително размерът им. Капсулираните в силика-шел и PEG-илирани QD са подходящи за визуализиране на кръвоносни съдове до 600-700  $\mu\text{m}$  дълбочина под мозъчната кора с използване на дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия. При интравенозното им инжектиране в експериментални животни (плъхове и мишки) в концентрации до 1  $\mu\text{mol/kg b.w.}$  не се наблюдават промени в кръвното налягане и сърдечния ритъм на животното, а до 400  $\text{nmol/kg b.w.}$  не се наблюдават и промени в диаметъра на мозъчните кръвоносни съдове (артериолите и венулите). Най-малките визуализирани кръвоносни съдове са с диаметър 6-10  $\mu\text{m}$ . Това прави тази QD-проба в пъти по-добра от конвенционалните за тази цел проби (например, FITC-декстран) и подходяща за изучаване *in vivo* на фактори, повлияващи вазоконстрикцията, вазодилатацията и мозъчната микроциркулация с използване на дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия.

Конюгирането на капсулирани в силика-шел и PEG-илирани QD с хелатори за парамагнитни йони, позволява разработването на проби с две и повече имиджинг модалности. На тази база е разработена мултимодална проба за флуоресцентен имиджинг анализ и MRI. Пробата е подходяща за визуализиране на тумори в експериментални животни *in vivo*, като MRI позволява визуализиране на тумор с големина  $\sim 2$   $\text{mm}$  в диаметър – в ранния стадий на неговото развитие (на 3-я ден от инокулацията на туморните клетки в организма).

Трябва да се отбележи, че представените по-горе изследвания са насочени предимно към флуоресцентно визуализиране на структурата на кръвоносни съдове и тумори. QD-пробите със сензорни свойства, обаче, имат изключително голям потенциал и за функционалната флуоресцентна образна диагностика *in vivo* [Bakalova, 2007c].

## V. Фотосенсибилизация на ракови клетки с QD-проби

В началото на 90-те години беше показано, че някои полупроводникови нанокристали (в частност,  $\text{TiO}_2$ ) притежават фотосенсибилизиращи свойства и биха могли да бъдат използвани за фотодинамична терапия на тумори [Cai et al., 1991; Ireland et al., 1993; Wamer et al., 1997]. Фотосенсибилизиращите свойства на наночастиците от  $\text{TiO}_2$  се обясняват с генерирането на активни форми на кислорода при неговото окисление в резултат на продължително UV-облъчване (в диапазона 320-400  $\text{nm}$ ) във водни разтвори [Harbour et al., 1985; Sugitomo et al., 1988; Konaka et al., 1999]. Този механизъм лежи в основата и на бактерицидната активност на  $\text{TiO}_2$  [Ireland et al., 1993].

Тези изследвания провокираха у нас идеята, че полупроводниковите наночастици CdSe също биха могли да бъдат потенциални фотосенсибилизатори. Ширината на забранената енергетична зона на QD CdSe е значително по-голяма от минималните 0.97 eV, необходими за реализиране на процеси на триплетен енергетичен пренос между възбуденото кристално ядро и молекулите на триплетния кислород, намиращи се в близост до ядрото. При този процес се генерира синглетен кислород и други активни форми на кислорода (супероксиден радикал, водороден пероксид и др.). Възможен е също енергетичен и/или електронен пренос между възбудения нанокристал и ендогенните и екзогенни хромофори в клетките. Индуцирането на такива процеси в клетъчни суспензии би могло да доведе до фотосенсибилизация на клетките и развитие на апоптоза и некроза.

През декември, 2003, Samia et al. показаха за първи път възможността за генериране на синглетен кислород от

QD CdSe, при облъчването на наночастиците с видима светлина в органичен разтворител [Samia et al., 2003]. През юли, 2004, нашият колектив публикува за първи път данни за фотосенсибилизация на ракови клетки в присъствие на неупаковани QD CdSe и продължително UV-облъчване [Bakalova et al., 2004a,b]. Резултатите от това изследване разкриваха възможности за нови приложения на QD в биологията и медицината, а именно – като нова генерация фотосенсибилизатори и/или като субстанции, повишаващи ефективността на конвенционалните фотосенсибилизатори, намиращи приложение във фотодинамичната терапия на тумори.

В работата използвахме следната флуоресцентна QD-проба – водоразтворими наночастици CdSe с широк спектър на емисия (описани в раздел I.1. на *Експериментални резултати*), конюгирани с анти-CD90 антитяло. Анти-CD90 е с висок афинитет към левкемични лимфоцити, изолирани от пациенти с акутна лимфобластна левкемия, и не взаимодейства с нормални лимфоцити, изолирани от здрави донори [Bakalova et al., 2002, Ohba & Bakalova, 2003].

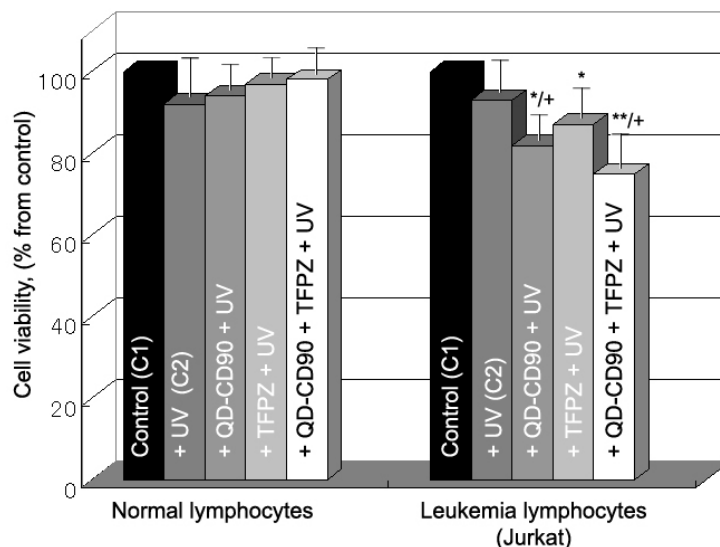
Левкемичните клетки (Jurkat) се инкубират с QD-анти-CD90 в продължение на 30 min, за да се гарантира свързване на антитялото със съответния антиген, експресиран на клетъчната повърхност. Клетките се отмиват трикратно с PBS (за да се отстрани несвързаното антитяло) и взаимодействието им с QD-анти-CD90 се доказва с флуоресцентна конфокална микроскопия. Левкемичните клетки се утаяват чрез центрофугиране (1000 x g/10 min), ресуспендират се в PBS в концентрация  $1 \times 10^6$  клетки/mL и се смесват със суспензия от нормални лимфоцити в концентрационно съотношение 1:1. Клетъчната суспензия, състояща се от левкемични и нормални лимфоцити, се подлага на UV-облъчване в продължение на 1 h, при следния режим: 10 min облъчване, 10 min прекъсване. За да се сведе до минимум нагряването по време на облъчването и да се осигурят „меки“ условия на третиране на клетките, между източника на UV-светлина и кюветата с клетъчна суспензия се поставя кварцова платформа и филтър (UTF-34U, Sigma-Koki), рестриктиращ лъчите под 340 nm. След прекратяване на облъчването, клетъчната суспензия се подлага на лектин-афинитетна хроматография за разделяне на двете клетъчни фракции [Bakalova et al., 2002, 2003]. Като немобилна фаза се използва CNBr-активирана Sepharose® 6MB, конюгирана със соев аглутинин (SBA). Нормалните лимфоцити се елуират лесно и бързо чрез PBS, докато левкемичните клетки се задържат в колоната и се елуират с N-ацетил-D-галактозамин. Типа на клетките във всяка една фракция след разделянето се доказва чрез флуоресцентна конфокална микроскопия и флоуцитометрия. За флуоресцентно маркиране на нормалните лимфоцити се използва PE-анти-CD44 антитяло. Жизнеността на клетките в двете фракции се оценява по два метода – чрез флоуцитометричен и хемилуминисцентен анализи (CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega).

В паралелен експеримент, клетъчната суспензия, съдържаща нормални лимфоцити и QD-анти-CD90-свързани левкемични клетки, се инкубира в продължение на 10 min с трифлуоперазин (TFPZ) или сулфониран алуминиум-фталоцианин (SALPC), преди да бъде подложена на UV-облъчване. TFPZ и SALPC са конвенционални фотосенсибилизатори от фенотиазинов и, респективно, от порфиринов тип. TFPZ се възбужда в късовълновия диапазон на спектъра ( $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} \sim 312$  nm) и индуцира фотодинамични ефекти в живи клетки [Perez et al., 1998]. SALPC се възбужда във видимия диапазон на спектъра ( $\lambda_{\text{ex}}^{\text{max}} \sim 580$  nm) и е мощен фотосенсибилизатор от второ поколение, намиращ приложение във фотодинамичната терапия на тумори [Mathewa & Cui, 1990; Wang et al., 2003a]. Този експеримент има за цел да изясни възможността за енергетичен пренос между QD и класическия фотосенсибилизатор и индуциране и потенциране на фотосенсибилизацията ефект на последния.

В предварителни експерименти беше установено, че QD и органичните фотосенсибилизатори, добавени

поотделно или в комбинация към клетките, не повлияваха тяхната жизненост и не проявяваха цитотоксичност при използваните концентрации и отсъствие на UV-облъчване. Затова в изследванията използвахме два вида контроли: (i) клетъчни суспензии, нетретиранни с QD-анти-CD90 и/или органичен фотосенсибилизатор и подложени на същите въздействия (UV-облъчване) и манипулации (лектин-афинитетна хроматография) като третираните клетъчни суспензии; (ii) клетъчни суспензии, нетретиранни с QD-анти-CD90 и/или органичен фотосенсибилизатор и неподложени на UV-облъчване.

Резултатите на **Фигура 37** показват, че QD-анти-CD90, TFPZ и комбинацията QD/TFPZ (в използваните концентрации) не повлияват жизнеността на левкемичните клетки от линията Jurkat и на нормалните лимфоцити при отсъствие на UV-облъчване. Само по себе си UV-облъчването на клетъчната суспензия в отсъствие на QD и/или TFPZ индуцира слаба цитотоксичност и в двете клетъчни линии – броят на живите клетки се понижава с около 8-10% след облъчването. Третирането на клетъчната суспензия с QD-анти-CD90 и последващото ѝ облъчване с UV-светлина води до фотосенсибилизация на левкемичните клетки – броят на живите левкемични клетки се понижава с около 20%, без да се повлиява допълнително жизнеността на нормалните лимфоцити. TFPZ повлиява слабо жизнеността на левкемичните клетки. Слабият фотосенсибилизиращ ефект на TFPZ би могъл да се обясни с рестрикцията на ултравиолетовите лъчи под 340 nm в използваната експериментална постановка и изключително слабото му възбуждане (TFPZ е с максимум на възбуждане при 312 nm). При използване на комбинацията QD/TFPZ не се наблюдава адитивен или синергичен фотосенсибилизиращ ефект. Резултатите показват също, че TFPZ, както и комбинацията QD/TFPZ не индуцират ефект на фотосенсибилизация в нормалните лимфоцити.



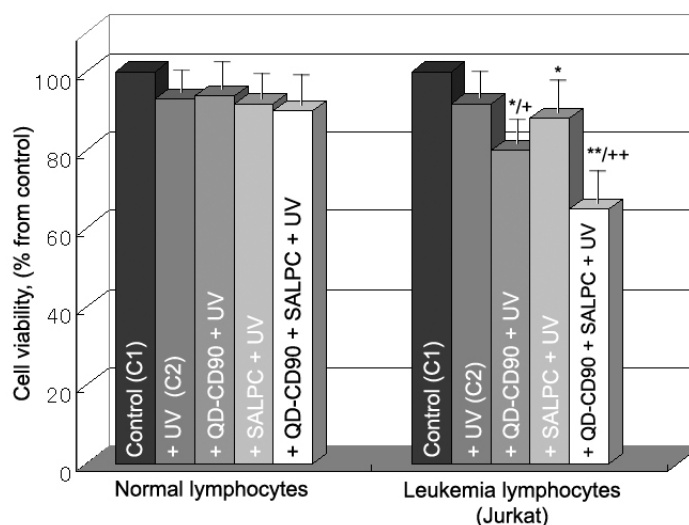
**Figure 37.** Viability of leukemia and normal lymphocytes before and after treatment with QD-anti-CD90 (0.1 mg/mL), trifluoperazine (TFPZ, 1  $\mu$ M), and/or UV-irradiation. C1 – control without UV; C2 – control + UV; \* $p < 0.05$  vs C1; \*\* $p < 0.01$  vs C1; + $p < 0.01$  vs C2.

Общоприето е схващането, че фотодинамичните ефекти на TFPZ върху живи клетки са опосредствани от взаимодействието му с калмодулина и локалното генериране на активни форми на кислорода в клетките [Motohashi et al., 1999; Lam et al., 2001; Lever et al., 1997]. Взаимодействието на TFPZ с калмодулина подтиска активността на калциевата помпа и  $Ca^{2+}$ -зависимите калиеви канали на повърхността на клетъчната мембрана [Lam et al., 2001; Lever et al., 1997]. Неотдавна беше показано, че нисковолтажните Kv1.3 канали, експресирани

при човешки Т-лимфоцити, каквито са тези от линията Jurkat, са най-чувствителни на фотодинамичните ефекти на TFPZ [Teisseyre & Michalak, 2003]. Тъй като суспензията от нормални лимфоцити включва няколко типа клетки (не само Т-лимфоцити), повлияването на Kv1.3 каналите може да обясни поне отчасти, разликата в ефектите на TFPZ върху жизнеността на левкемичните и нормалните клетки при облъчване с UV-светлина.

Що се отнася до фотосенсибилизиращия ефект на QD, неговият механизъм би могъл да се обясни с класическата схема на енергетичен пренос между възбудените наночастици CdSe и триплетния кислород с генериране на високотоксични активни форми на кислорода в живите левкемични клетки [Juzenas et al., 2008]. Доколкото QD са свързани посредством антитялото на повърхността на левкемичните клетки, може да се твърди, че генерирането на активни форми на кислорода протича локално и уврежда предимно левкемичните клетки.

На **Фигура 38** са представени резултатите от анализа на фотосенсибилизиращия ефект на класическия фотосенсибилизатор SALPC и комбинацията му с QD-анти-CD90 върху левкемични и нормални лимфоцити. SALPC, QD-анти-CD90 и тяхната комбинация не сенсibiliзират нормалните лимфоцити по отношение ултравиолетовите лъчи. Жизнеността на клетките е съизмерима с тази в суспензията, подложена единствено на UV-облъчване. SALPC не индуцира цитотоксичност и при левкемичните клетки, подложени на UV-облъчване. Липсата на фотосенсибилизиращ ефект на SALPC при нормалните и левкемичните лимфоцити е резултат от липсата на възбуждане на фотосенсибилизатора от ултравиолетовата светлина. SALPC се възбужда във видимата област на спектъра (~560-580 nm) и фотосенсибилизиращите му свойства се проявяват при облъчване с видима светлина.



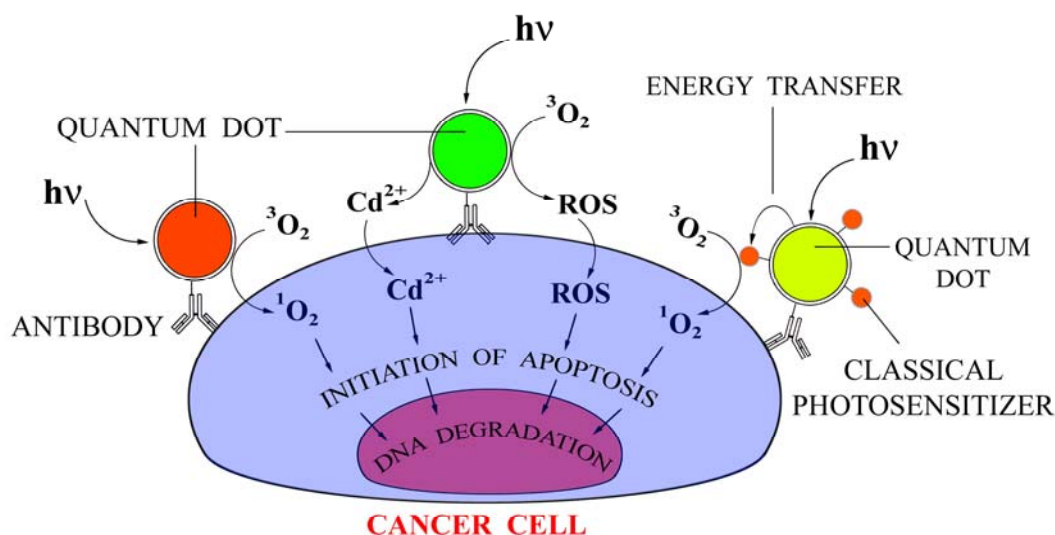
**Figure 38.** Viability of leukemia and normal lymphocytes before and after treatment with QD-anti-CD90 (0.1 mg/mL), sulfonated aluminium phthalocyanine (SALPC, 1  $\mu$ M), and/or UV-irradiation. C1 – control without UV; C2 – control + UV; \* $p < 0.05$  vs C1; \*\* $p < 0.01$  vs C1; + $p < 0.05$  vs C2; ++ $p < 0.01$  vs C2.

Комбинацията SALPC + QD-анти-CD90, обаче, води до фотосенсибилизация на левкемичните клетки. При третиране на клетките с двата компонента и последващото им UV-облъчване се наблюдава ясноизразен цитотоксичен ефект – около 25% над този, регистриран при съспензията, подложена само на UV-облъчване, и около 15% над този, регистриран при суспензията, третирана с QD-анти-CD90 и подложена на UV-облъчване. QD-пробата потенциира ефекта на SALPC, което може да се обясни с възбуждане на фотосенсибилизатора от QD (в резултат на FRET) и последващо генериране на синглетен кислород и/или свободни радикали (в резултат

на TET между SALPC и кислорода в системата).

Фотодинамичните ефекти на SALPC се обясняват с регулацията на клетъчната сигнализация чрез модулиране структурата на мембранните белтъци от генерирания синглетен кислород [Wang et al., 2003a; Matthews & Cui, 1990]. Нашите резултати показват, че QD потенцирира ефекта на SALPC.

Регистрираната цитотоксичност на QD-анти-CD90 при левкемични клетки, подложени на UV-облъчване в отсъствие или присъствие на органичен фотосенсибилизатор от порфиринов или феноиазинов тип, би могла да се обясни най-общо с няколко независими един от друг механизма (Схема 7): (i) откъсване на свободни кадмиеви йони от повърхността на нанокристала под въздействие на UV-облъчването и последващо индуциране на кадмиева цитотоксичност [Derfus et al., 2004a]; (ii) генериране на активни форми на кислорода в клетъчната суспензия като резултат от TET и/или електронен пренос между QD и акцепторни молекули от околната среда (кислород и/или клетъчни структури); (iii) TET или електронен пренос между QD и органичния фотосенсибилизатор, добавен към клетките, и генериране на синглетен кислород при възбуждане на фотосенсибилизатора; и (iv) директно и индиректно повлияване на клетъчната сигнализация и индукция на апоптоза в клетките.



Scheme 7. Potential mechanisms for QD-induced cell death [Bakalova et al., 2004a].

Възможността за освобождаване на кадмиеви йони от повърхността на неупаковани в допълнителен шел QD CdSe при продължително UV-облъчване и индуцирането на цитотоксичност е демонстрирано в работата на Derfus et al. (2004a). Авторите използват водоразтворими QD CdSe, чиито хидрофобни координационни лиганди (ТОРО) са заменени с меркаптопропионова киселина, така че повърхността на наночастицата да бъде минимално защитена – модел, много близък до нашия. Наночастиците са подложени на UV-облъчване ( $\lambda=365$  nm;  $15$  mW/cm<sup>2</sup>) в продължение на 1 до 8 часа. Измерена е концентрацията на свободните кадмиеви йони в QD-суспензиите, преди и след прекратяване на UV-облъчването. Установено е, че концентрацията на свободните кадмиеви йони в UV-облъчените QD-суспензии нараства от 60 до 300  $\mu$ M при облъчване от нула до 60 min. Към облъчените QD-суспензии след това са добавени хепатоцити и е изследвано влиянието на QD върху

жизнеността на клетките след 24-часова инкубация. При концентрация на свободните кадмиеви йони 300  $\mu\text{M}$  е наблюдаван много слаб цитотоксичен ефект (~6%).

В нашия експеримент, условията на облъчване на клетъчните суспензии с UV-светлина са доста по-щадящи от тези, описани в [Defrus et al. \(2004a\)](#). Ние използвахме UV-облъчване с мощност 1.4  $\text{mW}/\text{cm}^2$  (около 10 пъти по-слаба) при режим 10 min облъчване, 10 min почивка, с общо времетраене на облъчването 30 min. При тези експериментални условия, количеството на свободните кадмиеви йони в реакционната среда би следвало да не превишава 200  $\mu\text{M}$ . В серия експерименти установихме, че в концентрационния интервал 20-200  $\mu\text{M}$ , кадмиевите йони не проявяват цитотоксичност по отношение на левкемичните клетки от линията Jurkat при инкубация в течение на 24 часа. Трябва да се отбележи също, че [Derfus et al. \(2004a\)](#) наблюдават изместване на абсорбционния и емисионния максимуми на QD CdSe в по-късовълновата област на спектъра при облъчването на наночастиците с UV-светлина от 1 до 8 часа. Авторите обясняват тези спектрални промени с отделянето на атоми от повърхността на QD и намаляване на нейните размери. При нашите експериментални условия не бяха регистрирани промени в позицията на абсорбционния и емисионния максимуми на конюгатите QD-анти-CD90 при UV-облъчването им в буфер, което е пряко доказателство за отсъствие на фоторазграждане и деструкция на повърхността на нанокристалата с освобождаване на кадмиеви йони в околната среда. Тези наблюдения показват, че ролята на свободните кадмиеви йони е незначителна, що се отнася до наблюдавания от нас фотосенсибилизиращ ефект на конюгатите QD-анти-CD90 по отношение на клетките от линията Jurkat (Фигури 37 и 38).

Друга възможна причина за фотосенсибилизиращите свойства на QD CdSe е генерирането на активни форми на кислорода и/или свободни радикали при UV-облъчването на клетки, свързани с конюгатите QD-анти-CD90. Възможността за генериране на свободни радикали при облъчване на QD с UV или видима светлина беше показана от две изследователски групи [[Green & Howman, 2005](#); [Lovric et al., 2005](#)] година след публикуване на нашата работа в *Nano Letters*. За целта са използвали EPR-спектроскопия или флуоресцентна спектроскопия в присъствие на сенсори за активни форми на кислорода (5,5-диметил-1-пиридин-N-оксид или дихидроетидиум). По-късно бяха публикувани и други изследвания, доказващи нашата хипотеза за участието на свободно-радикални процеси във фотосенсибилизацията на клетки в присъствие на QD [[Clarke et al., 2005](#); [Dayal et al., 2006](#); [Hsieh et al., 2006](#); [Tsay et al., 2007](#); [Anas et al., 2008](#); [Chatterjee et al., 2008](#); [Claessens et al., 2008](#); [Dayal & Burda, 2008](#); [Tang et al., 2008](#); [Chang et al., 2009](#); [Chen et al., 2010](#); [Dumas et al., 2009](#); [Li et al., 2009](#); [Lu et al., 2009](#); [Yaghini et al., 2009](#)].

Ние също установихме натрупване на продукти на свободно-радикално окисление на липидите в клетъчните суспензии, подложени на UV-облъчване в присъствие на конюгати QD-анти-CD90 и органичен фотосенсибилизатор. Свободно-радикалното окисление на липидите беше оценявано по натрупването на малонов диалдехид (MDA) – краен продукт от липидната пероксидация на полиненаситените мастно-киселинни остатъци в третираните клетъчни суспензии.

Анализът на изложените по-горе експериментални данни, както и на резултатите, публикувани от други автори, дават основание да се счита, че индукцията на активни форми на кислорода е един от най-вероятните механизми, обясняващи фотосенсибилизиращите свойства на QD CdSe при продължително облъчване с UV-светлина.

QD биха могли също да участват в образуването на FRET двойки с органичните фотосенсибилизатори и да

потенцират техният фотосенсибилизиращ ефект в живите обекти. През 2006, [Shi et al.](#) публикуваха данни за QD, конюгирани с органичен фотосенсибилизатор [мезо-тетра(4-сулфонатофенил)порфин дихидрохлорид] и показаха възможността за ефективно генериране на синглетен кислород (с квантов добив ~43%) при облъчване на 355 nm, където възбуждането на порфирина е минимално. Авторите обясняват този ефект с FRET между възбудените QD и молекулите на фотосенсибилизатора, свързани на повърхността на QD. През 2007, [Tsay et al.](#) конюгират QD с роз-бенгал и хлорин-еб и потвърждават тезата на [Shi et al. \(2006b\)](#), както и изказаното от нас през 2004-та година предположение, че QD може да потенцират ефекта на класическите фотосенсибилизатори в резултат на протичане на FRET.

През 2007, групата на D. Maysinger [[Choi et al., 2007d](#)] показа, че QD-индуцираната цитотоксичност е свързана и с директно или индиректно повлияване на клетъчната сигнализация, като активиране на туморния некротичен фактор (Fas), активиране на каспазите и деполяризация на митохондриалната мембрана.

\* \* \*

В заключение, представеният по-горе експериментален модел показва, че QD CdSe притежават фотосенсибилизиращи свойства. Неупаковани водоразтворими наночастици CdSe сенсibiliзират левкемичните клетки по отношение на ултравиолетовата светлина и индуцират цитотоксични ефекти. Експерименталните резултати показват, че при условията на описания експеримент, UV-индуцираната цитотоксичност на QD не е резултат от освобождаването на кадмиеви йони от повърхността на нанокристалата и индукция на кадмиева цитотоксичност. QD допринасят също за експресия на фотосенсибилизиращия ефект на порфирина SALPC при продължително UV-облъчване, което може да се обясни с енергетичен пренос между двата флуорофора – QD като донор на енергия и SALPC като акцептор на енергия. Това, от своя страна, води до възбуждане на порфириновия фотосенсибилизатор и генериране на синглетен кислород.

Публикуваните по-късно експериментални данни от други авторски колективи дават основание да се счита, че при продължително UV-облъчване на неупаковани QD CdSe и CdTe се индуцират процеси, водещи до генериране на активни форми на кислорода в клетките, както и повлияване на клетъчната сигнализация и индукция на апоптоза и некроза.

Първите резултати от нашето изследване бяха патентовани и публикувани в средата на 2004 в *Nano Letters* и *Nature Biotechnology*. Това беше първото изследване, показващо възможността за фотосенсибилизация на живи клетки от QD. Редица изследователски колективи по-късно потвърдиха нашите резултати и изказаната от нас хипотеза (представена на Схема 7), използвайки различни клетъчни линии и различни схеми на облъчване на живи клетки с ултравиолетова или видима светлина в присъствие на неупакован водоразтворим QD CdSe или CdTe – самостоятелно или в комбинация с конвенционални органични фотосенсибилизатори [[Clarke et al., 2005](#); [Chan et al., 2006](#); [Dayal et al., 2006](#); [Hsieh et al., 2006](#); [Shi et al., 2006b](#); [Choi et al., 2007c](#); [Iga et al., 2007](#); [Tsay et al., 2007](#); [Anas et al., 2008](#); [Chatterjee et al., 2008](#); [Dayal & Burda, 2008](#); [Yang et al., 2008](#); [Chang et al., 2009](#); [Biju et al., 2010](#); [Blanco et al., 2009](#); [Li et al., 2009](#); [Lu et al., 2009](#); [Yaghini et al., 2009](#); [Chen et al., 2010](#)].

## Изводи

1. Разработени са нов вид QD CdSe, получени при нуклеиране и растеж на „стайна температура”. Наночастиците се характеризират с: малки хомогенни размери (~2 nm в диаметър); кубична, плътно опакована сфалеритна структура на кристалната решетка; широка „deep-trap” флуоресцентна емисия; висок квантов добив (~40-50%); голямо Стоксово отместване между първия пик на екситона в абсорбционния спектър и емисионния максимум (над 100 nm); дълго време на живот на „time-resolved” флуоресценцията (20-40 ns); висока колоидна стабилност във физиологични разтвори и телесни течности.
2. Разработена е нов методичен подход за получаване на няколко хомогенни по размер QD фракции CdSe от една реакционна система в бавно нарастващ температурен градиент (от 110 до 250 °C). Методът позволява да се избегне Оствалдовия растеж на кристалите, причиняващ дефокусиране на размера при висока температура. Наночастиците се характеризират с тесни спектри на „band-edge” флуоресцентна емисия (fwhm = 27-33 nm) и сравнително висок квантов добив в органичен разтворител (35-60% в зависимост от размера им). Прехвърлянето на QD CdSe от органична във водна фаза, чрез директна замяна на хидрофобните координационни лиганди с амфифилни, води до драстично понижаване на квантовия добив (<0.5%) и колоидната им стабилност във физиологични разтвори. Пасивирането на повърхността на кристалното ядро CdSe с обвивка ZnS води до повишаване на квантовия добив до 40-70% в органичен разтворител или 10-20% във водна среда (при директна замяна на хидрофобните координационни лиганди с амфифилни).
3. Показано е, че свободните кадмиеви и селениеви прекурсори в непречистени QD CdSe са основен фактор за пасивиране на повърхността на кристалните ядра при „стареене” в органичен разтворител и модифициране на техните спектрални характеристики – повишаване на интензитета на флуоресценцията, растеж на кристалите и фокусиране на размера.
4. Разработена е оригинална стратегия за получаване на високофлуоресцентни водоразтворими QD CdSe/ZnS чрез запазване на хидрофобните координационни лиганди около кристалното ядро и опаковането на „QD-мицела” в силика-шел. Над 90% от наночастиците в популацията са изградени от един „QD-мицел” в една силика сфера. Опакованите в силика-шел „QD-мицели” се характеризират с тесни спектри на флуоресцентна емисия, висока колоидна стабилност и висок квантов добив в дестилирана вода (30-40%). Повърхността на силика-сферите е аминок-функционализирана. Конюгирането им с PEG повишава колоидната им стабилност във физиологични разтвори и ги прави подходяща матрица за разработване на мултифункционални и мултимодални бионанопроби.
5. Разработени са следните таргет-специфични флуоресцентни проби на базата на водоразтворими QD CdSe с „deep-trap” флуоресцентна емисия: QD-лектин и QD-антитяло. Показано е, че QD-лектинът (QD-SBA) е подходящ флуоресцентен маркер за идентифициране на високодиференцирани левкемични лимфоцити от нормални лимфоцити с флуоресцентна конфокална микроскопия и флоуцитометрия. Използването на QD води до значително повишаване на чувствителността на флуоресцентния микроскопски анализ и осигурява възможност за продължително скениране (> 30 min) без загуба на флуоресцентния сигнал, което улеснява локализирането на обекта и неговия анализ. Клетки, маркирани с QD-лектин, показват многократно по-стабилна във времето флуоресценция ( $\tau_{1/2} > 30$  min за QD-SBA и ~10 sec за FITC-SBA) и няколко пъти по-високо съотношение сигнал/фон от клетките, маркирани с FITC-SBA, когато се облъчват в областта на



- максимума на възбуждане на QD. Показано е също, че конюгатите QD-антитяло са подходящи за анализ на вътреклетъчни антигени във фиксирани клетки, с използване на флуоресцентна конфокална микроскопия и флоуцитометрия. Не са наблюдавани артефакти в микроскопските изображения и хистограмите, което се дължи на високата колоидна стабилност на QD-антитялото и липсата на агрегация в цитоплазмата.
6. Разработени са два високочувствителни QD-базирани имуноблот анализа на протеини с флуоресцентна детекция. Единият от анализите позволява детекция на протеини, намиращи се в много ниски количества в клетъчния лизат, без предварителната им преципитация и концентриране.
  7. Разработена е флуоресцентна „хибридизационна проба” на базата на водоразтворими QD CdSe/ZnS (с диаметър ~4.5 nm), конюгирани с олигонуклеотиди. Пробата е структурирана от една наночастица, свързана ковалентно с няколко олигонуклеотидни секвенции (от 21-23 bp) в съотношение 1:6.2, чрез 39-атомен спейсър. Характеризира се с тясна „band-edge” флуоресцентна емисия ( $\lambda_{em}^{max}=580$  nm) и висока стабилност във физиологични разтвори. Спейсърът осигурява дистанция между QD и олигонуклеотида в рамките на Фьорстеровия радиус (1-10 nm). Това позволява използването на пробата за разработване на хибридизационни анализи, базирани се на флуоресцентно-резонансен енергетичен пренос (FRET) между QD и органичен флуорофор, разположен върху олигонуклеотида.
  8. На базата на QD-олигонуклеотидните хибриди (QD-siRNA) е разработен FRET-анализ *in vitro* за селекция на антисенс-siRNA секвенции с висок афинитет към таргетната сенс-mRNA (белязана със Cy5 – Cy5-mRNA). Експериментално установената ефективност на FRET в двойката QD/Cy5 (донор/акцептор) е ~35-40% при хибридизация на QD-siRNA и Cy5-mRNA. Установена е корелация между амплитудата на FRET-сигнала и ефективността на хибридизация между секвенциите ( $r = 0.7358$ ), както и между амплитудата на FRET-сигнала и специфичния антисенс ефект на siRNA ( $r = 0.8456$ ), регистриран със стандартните тестове (RT-PCR и имуноблот). Това дава основание да се счита, че разработеният FRET-анализ би могъл да се използва и за прогнозиране на ефективността на siRNA секвенциите по отношение на регулацията на генната експресия, преди да бъдат трансфектирани в клетки и анализирани със стандартните молекулярно-биологични тестове.
  9. Показано е, че видът и структурата на биоорганичната обвивка на QD е от съществено значение за тяхната цитотоксичност. Обвитите в амфифилни катионни дендримери, но некапсулирани QD имат цитотоксично действие и не са подходящи проби за *in vivo* анализи. В концентрации над 50 nM, те проявяват цитотоксичност на изолирани клетки, придружена от загуба на митохондриалния потенциал. При инжектирането им венозно в плъхове (300 pmol QD/kg b.w.) настъпват промени в кръвното налягане, сърдечния ритъм и мозъчната циркулация, както и силно влошаване на качеството на флуоресцентните микроскопски изображения, получени при визуализиране на кръвоносните съдове в мозъка. Капсулираните в анионни дендримери QD не показват цитотоксични ефекти (в концентрации до 500 nM). При инжектирането им в плъхове не се наблюдават промени във физиологичните характеристики на животното и са подходящи за визуализиране на кръвоносни съдове *in vivo*.
  10. Разработена е QD-проба за приложение в *in vivo* анализи – капсулирани в силика-шел и PEG-илирани QD CdSe/ZnS. Пробата е подходяща за визуализиране на кръвоносни съдове до 600-700  $\mu$ m дълбочина под мозъчната кора с използване на дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия. При интравенозното й

инжектиране в плъх (до 1  $\mu\text{mol/kg b.w.}$ ) не се наблюдават промени в кръвното налягане и сърдечния ритъм на животното, а до 400  $\text{nmol/kg b.w.}$  не се наблюдават и промени в диаметъра на мозъчните кръвоносни съдове. QD-пробата позволява да се визуализират кръвоносни съдове с диаметър 6-10  $\mu\text{m}$  в 3D проекция с продължително скениране, което я прави несравнимо по-добра от конвенционалните за тази цел проби (например, FITC-декстран). QD-пробата е подходяща за изучаване *in vivo* на фактори, повлияващи вазоконстрикцията, вазодилатацията и мозъчната микроциркулация с използване на дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия.

11. Разработени са две мултифункционални QD-проби, на базата на капсулирани в силика-шел QD CdSe/ZnS, хелатор за гадолиневи йони (DOTA/Gd или Resolve-Al<sup>TM</sup>/Gd) и PEG1100. Хибридният наночастици QD-Resolve-Al<sup>TM</sup>/Gd са с оригинална структура, притежаваща редица предимства пред описаните в литературата мултимодални проби. Показано е, че и двете мултимодални проби се характеризират с висок флуоресцентен и MRI контраст и са подходящи за визуализиране на тумори в експериментални животни *in vivo* на базата на ангиогенезата, чрез използване на флуоресцентен имиджинг и MRI.
12. Установено е, че неупакованите в биоорганични обвивки водоразтворими QD CdSe, с широка „deep-trap” флуоресцентна емисия, притежават фотосенсибилизиращи свойства. На тази база е разработена QD-проба (QD-анти-CD90) за фотосенсибилизация на туморни клетки при облъчване с ултравиолетова светлина. Показано е, че UV-индуцираната цитотоксичност на QD не е резултат от освобождаването на кадмий и може да се отдаде на локалното генериране на активни форми на кислорода и/или свободни радикали в клетките, свързани с пробата чрез антиген-антитяло взаимодействия. QD допринасят и за експресия на фотосенсибилизиращия ефект на конвенционалните органични фотосенсибилизатори от порфиринов тип при продължително UV-облъчване, което може да се обясни с триплетен енергетичен пренос между двата флуорофора и генериране на синглетен кислород от възбудения порфиринов фотосенсибилизатор.

## Справка за приносите

### **Приноси с оригинален характер**

1. За първи път са описани QD CdSe, получени при нуклеиране и растеж на „стайна температура”, характеризиращи се с малък хомогенен размер (~2 nm в диаметър), широк спектър на „deep-trap” флуоресцентна емисия и висок квантов добив (~50%) във физиологични разтвори. Наночастиците са подходящи за разработване на таргет-специфични флуоресцентни проби за имиджинг анализи и фотосенсибилизация. Методът е защитен с патент.
2. Разработен е оригинален метод за едновременното получаване на минимум шест хомогенни по размер QD-фракции CdSe в бавнонаращащ температурен градиент. Методът позволява да се избегне Оствалдовия растеж на нанокристалите и да се получат QD-фракции с фокусиран размер и флуоресцентната емисия и сравнително висок квантов добив в органичен разтворител (35-60%). Методът е защитен с патент.  
След опаковане на кристалните ядра CdSe с няколко монослоя ZnS и капсулирането им в биопоносими органични обвивки (дендримери или силика-шел), наночастиците са подходящи за разработване на таргет-специфични флуоресцентни проби за мултиплексни имиджинг анализи.

3. Разработена е оригинална стратегия за получаване на високофлуоресцентни водоразтворими QD CdSe/ZnS, капсулирани в силика-шел. Наночастиците са изградени от една QD в една силика-сфера и се характеризират със сравнително малък размер (~20 nm в диаметър) и висок квантов добив във водна среда (30-40%). На тяхна база е разработена оригинална мултимодална QD-проба, комбинираща флуоресцентни и парамагнитни контрастни свойства. Методът е защитен с патент.
4. За първи път е разработена флуоресцентна проба на базата на конюгиране на QD с растителни лектини и е показано, че пробата е подходяща за идентифициране на високодиференцирани левкемични лимфоцити от нормални лимфоцити с флуоресцентна конфокална микроскопия и флоуцитометрия.
5. За първи път са разработени нанохибриди QD-протеин (QD-лектин и QD-антитяло), изградени на принципа – една протеинова молекула, свързана химично с няколко малки по размер QD (~2 nm в диаметър). Описаните дотогава в литературата QD-протеинови нанохибриди са изградени на принципа – една голяма QD (над 10 nm в диаметър), конюгирана с няколко биомакромолекули.
6. Паралелно и независимо от други авторски колективи, QD-проби са приложени за флоуцитометричен анализ на антигени, разположени на повърхността на живи клетки, както и за флоуцитометричен анализ на вътреклетъчни антигени във фиксирани клетки, като за първи път QD-проби не показват артефакти във флоуцитометричните изследвания на клетки.
7. Едновременно и независимо от други авторски колективи са разработени два високочувствителни QD-базирани имуноблот анализи на протеини (с флуоресцентна детекция). Единият от анализите позволява детекция на протеини, намиращи се в много ниски количества в клетъчния лизат, без предварителната им преципитация и концентриране. Методът е защитен с патент.
8. Разработена е оригинална „хибридизационна проба” за FRET-анализ, изградена от QD, конюгирани с олигонуклеотид чрез 39-атомен спейсър. На базата на тази проба е разработен оригинален метод за селекция на антисенс-siRNA секвенции с висок афинитет към таргетната сенс-mRNA, базиращ се на FRET между QD-белязани siRNA секвенции и Cy5-белязана mRNA секвенция, при хибридизация на комплементарните участъци.
9. Едновременно и независимо от други колективи мултимодална QD-проба е приложена за неинвазивно визуализиране на тумори в експериментални животни *in vivo* с флуоресцентен имиджинг и MRI. Показана е възможността за визуализиране на туморите в ранен стадий на тяхното развитие.
10. За първи път в света е показано, че неупаковани водоразтворими QD могат да се използват за фотосенсибилизация на клетки към светлинно облъчване. Разработена е оригинална QD-проба и метод за фотосенсибилизация на ракови клетки. Пробата и методът са защитени с патент.

### **Приноси с потвърдителен характер**

11. Потвърдено е, че свободните кадмиеви и селениеви прекурсори в непречистени QD CdSe са основен фактор за пасивиране на повърхността на кристалните ядра при „старене” в органичен разтворител и модифициране на техните спектрални характеристики – повишаване на интензитета на флуоресценцията, растеж на кристалите

и фокусиране на размера.

12. Потвърдено е, че времето на полуживот на флуоресценцията на клетки, маркирани с QD-белязани протеини, е значително по-дълго от това на клетки, маркирани с протеини, белязани с органичен флуорофор (FITC и Alexa). Това позволява продължително облъчване и скениране на QD-маркираните биологични обекти с ултравиолетова, видима и инфрачервена светлина, което улеснява тяхното локализиране и анализиране с флуоресцентна микроскопия.
13. Потвърдено е, че биоорганичната обвивка на QD определя стабилността и разтворимостта на наночастиците във високосолеви разтвори (каквито са физиологичните течности), тяхната биопоносимост и цитотоксичност и е от изключително значение за прилагането им в *in vivo* имиджинг анализи. Показано е, че неомрежената катионна дендримерна обвивка на QD води до висока цитотоксичност (респ. ниска биопоносимост) на QD-пробата и силно влошаване на качеството на флуоресцентните микроскопски изображения.
14. Потвърдена е възможността за визуализиране на кръвоносни съдове на дълбочина до 600-700  $\mu\text{m}$  под повърхността на мозъчната кора с биопоносими QD-проби и дву-фотон възбудена флуоресцентна микроскопия. Потвърдени са предимствата на QD-PEG пред FITC-декстрана за визуализиране на капилярната мрежа в мозъка.
15. Потвърдена е възможността за визуализиране на тумори по ангиогенезата в експериментални животни с помощта на QD-проби.

*Всички приноси са с приложен характер.*

## **НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА**

### **Патенти и заявки за патент**

1. Ohba H., Bakalova R., Z. Zhelev, M. Ishikawa, and Y. Baba. – New photosensitive medicine and method for producing the same, *Patent No. JP-2004-326539 (published – JP-2006-137682, July 1, 2006)*.
2. Ohba H., R. Bakalova, Z. Zhelev, T. Nagase, M. Ishikawa, and R. Jose. – Novel fluorescent probe for labeling biosample and its preparation method, *Patent No. JP-2004-096070 (published – JP-2005-283254, October 13, 2005)*.
3. Nagase T., Y. Makita, Z. Zhelev, R. Bakalova, V. Biju, R. Jose, Y. Makita, Y. Yamaoka, M. Ishikawa, and Y. Baba. – Synthesis of luminescent CdSe/ZnS core-shell nanocrystals via “green” chemical approach using zinc acetate as a zinc precursor, *Patent No. JP-2004-238756 (published – JP-2006-056733, March 2, 2006)*.
4. Jose R., Z. Zhelev, Y. Makita, T. Nagase, R. Bakalova, and M. Ishikawa. – Synthesis of highly luminescent CdSe quantum dots at room temperature, *Patent No. JP-2004-335914 (published – JP-2006-143526, July 8, 2006)*.
5. Zhelev Z., H. Ohba, R. Bakalova, and R. Jose. – Product patent: BroadYellowFluor-Quantum Dot (Carboxyl) – Ready for Bioconjugation, *Patent No. JP-2005-268776 (published – JP-2007-076975, March 29, 2007)*.
6. Bakalova R., Z. Zhelev, H. Ohba, and T. Kubo. – Product patent: Immunochemical detection method and reagent

kit for immunochemical detection, *Patent No. JP-2005-348157 (published – JP-2007-155395, June 21, 2007)*.

7. Zhelev Z., H. Ohba, R. Bakalova, and T. Kubo. – Product patent: Silica-shelled single quantum dot micelles with photosensitizing properties, *Patent No. 2006-112615*.
8. Bakalova R., and I. Kanno. – Method for highly reproducible synchronized synthesis of six size-homogeneous CdSe quantum dot fractions in slow-increasing temperature gradient, *Patent No. JP-2007-339936*.

### **Статии, публикувани в чужди научни издания (\*Кореспондиращ автор)**

1. Zhelev Z., R. Jose, T. Nagase, H. Ohba, R. Bakalova\*, M. Ishikawa, and Y. Baba. – Enhancement of the photoluminescence of CdSe quantum dots during long-term UV-irradiation: privilege or fault in life science research? *J. Photochem. Photobiol. B*, **75**(1-2), 2004, 99-105, impact factor - 1.871.
2. Bakalova R.\*, H. Ohba, Z. Zhelev, T. Nagase, R. Jose, M. Ishikawa, and Y. Baba. – Quantum dot anti-CD conjugates: Are they potential photosensitizers or potentiators of classical photosensitizing agents in photodynamic therapy of cancer? *Nano Lett.*, **4**(9), 2004, 1567-1573, impact factor – 9.991.
3. Bakalova R.\*, H. Ohba, Z. Zhelev, M. Ishikawa, and Y. Baba. – Quantum dots as photosensitizers? *Nature Biotechnology*, **22**(11), 2004, 1360-1361, impact factor - 29.495.
4. Bakalova R.\*, Z. Zhelev, R. Jose, T. Nagase, H. Ohba, M. Ishikawa, and Y. Baba. – Role of free cadmium and selenium ions for the enhancement of photoluminescence of CdSe quantum dots under ultraviolet irradiation, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **5**(6), 2005, 887-894, impact factor – 1.435.
5. Zhelev Z., H. Ohba, R. Bakalova\*, R. Jose, S. Fukuoka, T. Nagase, M. Ishikawa, and Y. Baba. – Fabrication of quantum dot-lectin conjugates as novel fluorescent probes for microscopic and flow cytometric identification of leukemia cells from normal lymphocytes, *Chemical Communications (Cambridge)*, (15), 2005, 1980-1982, impact factor – 5.504.
6. Bakalova R.\*, Z. Zhelev, H. Ohba, and Y. Baba. – Quantum dot-based western blot technology for ultrasensitive detection of “tracer” proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**(26), 2005, 9328-9329, impact factor – 8.580.
7. Bakalova R.\*, Z. Zhelev, H. Ohba, and Y. Baba. – Quantum dot-conjugated hybridization probes for preliminary screening of siRNA sequences, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**(32), 2005, 11328-11335, impact factor – 8.580.
8. Jose R., Z. Zhelev, R. Bakalova\*, Y. Baba, and M. Ishikawa. – White-light-emitting quantum dots synthesized at room temperature, *Appl. Phys. Lett.*, **89**, 2006, 013115, impact factor – 3.554.
9. Jose R., Z. Zhelev, T. Nagase, R. Bakalova, Y. Baba, and M. Ishikawa. – Self-surface passivation of CdX (X= Se, Te) quantum dots, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **6**(3), 2006, 618-623, impact factor – 1.435.
10. Zhelev Z., R. Bakalova\*, H. Ohba, R. Jose, Y. Imai, and Y. Baba. – Uncoated, broad fluorescent and size-homogenous CdSe quantum dots for bioanalyses, *Anal. Chem.*, **78**(1), 2006, 321-330, impact factor – 5.214.
11. Zhelev Z., H. Ohba, and R. Bakalova.\* – Single quantum dot-micelles coated with silica shell as potentially non-cytotoxic fluorescent cell tracers, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(19), 2006, 6324-6325, impact factor – 8.580.
12. Bakalova R.\*, Z. Zhelev, I. Aoki, H. Ohba, Y. Imai, and I. Kanno. – Silica-shelled single quantum dot micelles as imaging probes with dual or multimodality, *Anal. Chem.*, 2006, **78**(16): 5925-5932, impact factor – 5.214.
13. Ohba H., Z. Zhelev, and R. Bakalova. – Application of quantum dots for bioimaging, *Nippon Rinsho (Cell*

- Technology), **25**(8), 2006, 894-897 [на японски език] (статията включва оригинални резултати).
14. [Bakalova R.\\*](#), Z. Zhelev, and H. Ohba. – Quantum dots open new trends in biosensor evolution, *Sensor Lett.*, **4**(1-3), 2006, 1-3, impact factor – 0.626.
  15. Zlateva G., Z. Zhelev, [R. Bakalova\\*](#), and I. Kanno. – Precise size-control and synchronized synthesis of six colors of CdSe quantum dots in a slow-increasing temperature gradient, *Inorganic Chemistry*, **46**(16), 2007, 6212-6214, impact factor – 4.657.
  16. [Bakalova R.\\*](#), Z. Zhelev, H. Ohba, and Y. Baba. – Quantum dot-based nanobioprobes for fluorescent detection of molecular and cellular biological targets, “Nanotechnologies for the Life Science” (ed. Chala Kumar), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2007, Vol. 8 (“Nanotechnologies for Biosensors”), p. 175-207 (статията включва оригинални резултати).
  17. [Bakalova R.\\*](#), Z. Zhelev, I. Aoki, and I. Kanno. – Designing quantum dot probes, *Nature Photonics*, **1**(9), 2007, 487-489 (статията включва оригинални резултати), impact factor – 22.869.
  18. [Bakalova R.\\*](#), Z. Zhelev, I. Aoki, K. Masamoto, M. Mileva, T. Obata, M. Higuchi, V. Gadjeva, and I. Kanno. – Multimodal silica-shelled quantum dots: Direct intracellular delivery, photosensitization, toxic and microcirculation effects, *Bioconjugate Chemistry*, **19**(6), 2008, 1135-1142, impact factor – 4.350.
  19. [Bakalova R.\\*](#), Z. Zhelev, V. Gadjeva. – Quantum dots versus organic fluorophores in fluorescent deep-tissue imaging – merits and demerits, *Gen. Physiol. Biophys.*, 2008, **27**(4), 231-242, impact factor – 0.741.

#### **Статии (в пълен текст) в издания от научни форуми (Proceedings)**

20. Nagase T., T. Shibata, Z. Zhelev, R. Jose, [R. Bakalova](#), V. Biju, Y. Makita, Y. Shinohara, M. Ishikawa, and Y. Baba. – Synthesis of luminescent CdSe/ZnS core-shell nanocrystals via “Greener” chemical approach using zinc acetate as a zinc precursor, *Proceedings of the Third International Symposium on Signe-Molecule Bioanalysis and Nano-Biodesives*, November 24-26, 2004, Takamatsu, Japan, Ed. by Single-Molecule Bioanalysis Laboratory, AIST-Shikoku, Japan, 2004, p. 46-47.
21. Zhelev Z., H. Ohba, [R. Bakalova](#), R. Jose, T. Nagase, M. Ishikawa, Y. Shinohara, and Y. Baba, Y. – Quantum dot-lectin conjugates as new fluorescent markers for microscopic and flow cytometric identification of leukemia cells from normal lymphocytes, *Proceedings of the Third International Symposium on Signe-Molecule Bioanalysis and Nano-Biodesives*, November 24-26, 2004, Takamatsu, Japan, Ed. by Single-Molecule Bioanalysis Laboratory, AIST-Shikoku, Japan, 2004, p. 36-37.
22. Jose R., Z. Zhelev, T. Nagase, Y. Makita, [R. Bakalova](#), Y. Shinohara, Y. Baba, and M. Ishikawa. – Synthesis of highly luminescent CdSe quantum dots at room temperature, *Proceedings of the Third International Symposium on Signe-Molecule Bioanalysis and Nano-Biodesives*, November 24-26, 2004, Takamatsu, Japan, Ed. by Single-Molecule Bioanalysis Laboratory, AIST-Shikoku, Japan, 2004, p. 64-65.
23. Zhelev Z., [R. Bakalova](#), R. Jose, H. Ohba, M. Ishikawa, and Y. Baba. – Highly luminescent quantum dot-antibody conjugates for ultrasensitive detection of “tracer” proteins by flow cytometry and immunoblotting, *Annual Meeting of AIST Shikoku*, February 4, 2004, Takamatsu, Japan, Ed. by Single-Molecule Bioanalysis Laboratory, AIST-Shikoku, Japan, 2004, P12.
24. [R. Bakalova\\*](#), Zhelev Z., R. Jose, H. Ohba, T. Nagase, S. Fukuoka, M. Ishikawa, Y. Shinohara, and Y. Baba. –

Microscopic imaging and identification of leukemic cells from normal lymphocytes using quantum dot-lectin conjugates, Proceedings of the 8th Asia Pacific Conference on Electron Microscopy”, June 7-11, 2004, Kanazawa, Japan, Ed. by Japanese Society of Electron Microscopy, Kanazawa, Japan, 2004, p. 372-373.

25. Zhelev Z., R. Bakalova, and H. Ohba. – A composition of fluorescent nanoparticles and their application in life science, Proceedings of 44<sup>th</sup> Symposium on Powder Science and Technology, September 20-22, 2006, Kita-Kyushu, Japan, Ed. by Japanese Society of Powder Science and Technology, Kita-Kyushu, Japan, 2006, pp. 1.-5
26. Zhelev Z., R. Jose, R. Bakalova, Y. Imai, T. Kubo, H. Ohba, and H. Noma. – Photoluminescent properties of CdSe quantum dots at different synthetic conditions – relationship with structure and surface ligands, Transactions of Materials Research Society of Japan, 2006, **31**(2): 441-444.
27. Bakalova R.\*, I. Aoki, Z. Zhelev, and I. Kanno. – Quantum dots: from multimodal imaging diagnostics to radiation-induced photodynamic therapy of cancer, Proceedings of the Second Symposium of Molecular Imaging Center, NIRS-Chiba, October 19, 2007, Chiba, Japan, Ed. by National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japan, 2008, pp. 32-38 [in English/Japanese].

### **Финансирани проекти по темата на дисертацията**

1. Kakenhi-grant No. H21.5.31 (ръководител на проекта)

Тема на проекта: Nanobioprobes for multimodal imaging diagnostics of cancer in experimental animals.

Финансиран от: Ministry of Science, Labor and Technology of Japan

Срок: 2008-2010

2. Rijicho grant ‘2008 (участник в научния колектив)

Тема на проекта: Target-selective magnetic resonance imaging of colon cancer in experimental animals using originally synthesized multifunctional bionanoprobes

Финансиран от: President of the National Institute of Radiological Sciences (NIRS), Japan

Срок: 2008-2009

**ИМПАКТ ФАКТОР на публикациите по дисертацията – 122.70**

**ИНДИВИДУАЛЕН ИМПАКТ ФАКТОР на публикациите по дисертацията – 25.38**

**ПУБЛИКУВАНИ РЕЗЮМЕТА по дисертацията от участия в научни форуми – над 20**

**ОТЗИВИ относно публикациите по дисертацията – над 30**

**БРОЙ ЦИТИРАНИЯ на статиите по дисертацията – над 500**

*Списъци на цитатите, отзивите и резюметата са приложени към документите по дисертацията.*