

Лазерные нанотехнологии для биомедицинских приложений: применение наноразмерных углеродных частиц для изучения эмбрионального развития.

Цель проекта: проект направлен на разработку новых методов малоинвазивной визуализации внутриклеточных органелл эмбриональных клеток в процессе развития эмбриона с использованием люминесцентных зондов на основе углеродных наночастиц – наноалмазы и углеродные наноточки (С-точки).

Проект решает фундаментальные задачи:

1) Задачу использования оптических зондов для исследования биологических и биохимических процессов в предимплантационных эмбрионах на ранних стадиях развития. Решение этой задачи может открыть новые возможности к исследованию процессов превращения и перемещения внутриклеточного материала при развитии эмбриона и получению новых знаний об эмбриональном развитии с помощью оптических зондов. Решение этой задачи предполагает решение двух подзадач:

a. Подзадача формирования оптического зонда, С-точки внутри клетки при сохранении целостности мембран и биоматериала в ближнем окружении зонда без использования какой-либо дополнительной химической обработки клетки. Разработка методов преобразования биоорганического материала клетки в фемтолитровом объеме острогофокусированного излучения фемтосекундного лазера ближнего ИК диапазона в яркие люминесцентные С-точки в результате химических превращений фотоиндуцированных нелинейно-оптическим поглощением света.

b. Подзадача внедрения наночастиц алмаза с помощью лазерных пинцетов внутрь клетки для их использования в качестве спектральных зондов в моде люминесцентных меток и моде зондов комбинационного рассеяния. Эта задача предполагает разработку методов введения наноалмазных частиц через цитоплазматическую мембрану с помощью острогофокусированного излучения фемтосекундного лазера и оптических ловушек. Использование эффекта оптических ловушек, в том числе фемтосекундных оптических ловушек, для манипулирования в пространстве клетки наноалмазными частицами во внутреннем пространстве клетки.

c. Подзадача изучения свойств указанных выше оптических зондов в качестве оптических сенсоров для определения биохимических параметров биоматериала внутри клетки.

Разработка методов преобразования биомакромолекул различных органелл ооцитов и бластомеров ранних эмбрионов при сохранении цитоплазматической мембраны в люминесцентные центры (ЛЦ) при воздействии острогофокусированным фемтосекундными импульсами. Определение условий лазерного облучения, при которых образуются яркие люминесцентные центры.

Экспериментально изучен процесс образования ЛЦ в поле интенсивного фемтосекундного острогофокусированного лазерного излучения при воздействии на биомакромолекулы различной природы.

Эксперименты ставились следующим образом: фемтосекундное лазерное излучение ближнего ИК диапазона (длина волны около 780 нм) фокусировалось внутрь клетки или на цитоплазматическую мембрану клетки объективами микроскопа с апертурой NA от 0.6 до 1.4. Длительность фемтосекундного импульса составляла от 26 до 100 фс (длительность специально настраивали, измеряли в области перетяжки). Энергию импульса варьировали в диапазоне от долей нДж до сотен нДж. Для воздействия на мишень использовали как одиночные импульсы так и использовали пакеты импульсов (длительность пакета от ста микросекунд до десятков миллисекунд, частота следования импульсов 8 МГц).

Объектами изучения служили ооциты мыши, эмбрионы мыши на различных стадиях развития. Мишенями для воздействия служили ядрышко-подобное тельце GVооцита (ядрышко), хроматин герминальной

везикулы, цитоплазма ооцита/эмбриона, цитоплазматическая мембрана ооцита/эмбриона. Дополнительно к этому, для выявления химического механизма трансформации органического вещества в ЛЦ были выполнены опыты по изучению превращения ряда модельных химически чистых органических веществ в люминесцирующие частицы. Природа ЛЦ, образующихся в биообъектах и в модельных системах, определялась методами флуоресцентного анализа, люминесцентной микроскопии (в том числе двухфотонной люминесцентной микроскопии, конфокальной микроскопии, микроскопии комбинационного рассеяния и ИК микроскопии-спектроскопии, электронной просвечивающей микроскопии сверхвысокого разрешения).

Рисунок 1 демонстрирует типичные ЛЦ, которые мы наблюдали внутри ооцита мыши после воздействия фемтосекундным лазерным излучением. Было показано, что образование ЛЦ – вероятностный процесс, который существенно зависит от условий облучения и от природы органеллы. Показана зависимость вероятности образования ЛЦ от мощности и экспозиции излучения. Образование ЛЦ в богатом белком ядрышке (ядрышко подобном теле) происходит с большей вероятностью, чем в нуклеоплазме или цитоплазме. В плотной среде ядрышка ЛЦ более компактны в размере по сравнению с ЛЦ в цитоплазме или нуклеоплазме при тех же условиях облучения.

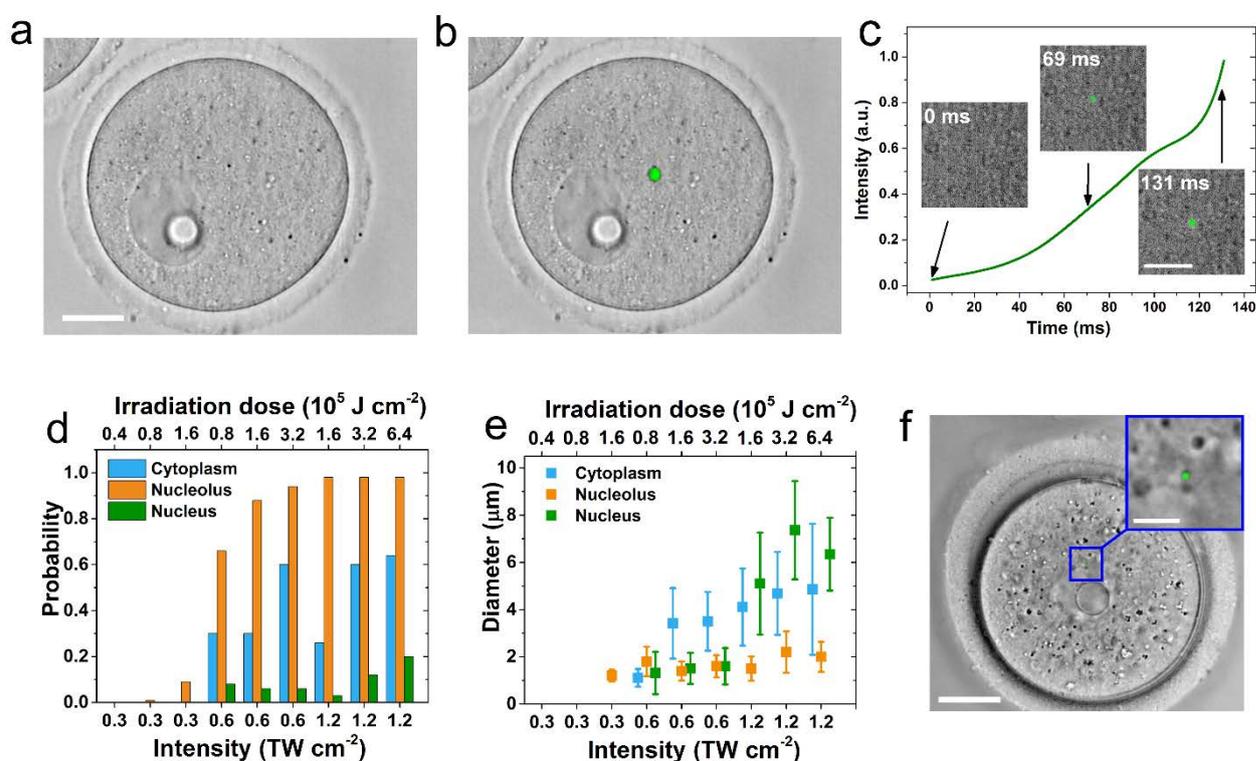


Рисунок 1. ЛЦ внутри ооцита (а) до лазерного воздействия, (б) после лазерного воздействия пакетом фемтосекундных импульсов: ЛЦ проявляется как зеленое пятно люминесценции, в данном случае сформировано пятно с большим диаметром ~4 μm. Шкала -20 μm. Пиковая плотность мощности лазерного импульса 1.2 TW/cm², длительность пакета импульсов 100 ms, частота следования импульсов 8 МГц. (с) Зависимость интенсивности 2-х фотонной люминесценции ЛЦ в зависимости от дозы облучения фемтосекундным лазером (пропорциональна времени облучения -длительности пакета импульсов 1.2 TW/cm² следующих с частотой 8 МГц). (d) Вероятность образования ЛЦ в зависимости от плотности мощности и дозы облучения (вероятность рассчитана по выборке n=30 испытаний) (e) Средний диаметр ЛЦ в различных органеллах ооцита в зависимости от плотности мощности и дозы облучения, (усреднение по n=30 испытаниям, показано стандартные отклонение). (f) субмикронный ЛЦ в цитоплазме ооцита. Совмещение люминесцентного изображения и изображения в светлом поле. Диаметр пятна 0.8 μm; шкала – 20 μm, шкала во вставке – 5 μm.

Результаты TOF-SIMS (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry), ИК микроскопии-спектроскопии, микроскопии-спектроскопии комбинационного рассеяния показали, что ЛЦ по составу содержат

полициклические графеноподобные фрагменты. Указанием на графеноподобные фрагменты является наличие D и G полос в спектрах комбинационного рассеяния ЛЦ. ИК спектры и масс-спектрокопия указывает на наличие замещенных органических соединений (выявлены аминные, карбоксильные группы в качестве боковых заместителей, гетероциклы с атомом азота). Морфология ЛЦ, выявленная методами электронной просвечивающей микроскопии высокого разрешения, видна на Рисунке 2. На данном этапе работы можно заключить, что ЛЦ представляют собой смешанные по составу наночастицы размером порядка десятков нанометров. Эти наночастицы склонны к образованию субмикронных агломератов. Вероятным механизмом их образования являются процессы карбонизации и графитизации органических молекул в нанобъемле плазмы низкой плотности, инициируемой высокоинтенсивным полем фемтосекундного лазерного излучения. По своей химической природе ЛЦ можно, предположительно, отнести к углеродным наночастицам (С-точкам). Будет продолжено изучение механизма их образования.

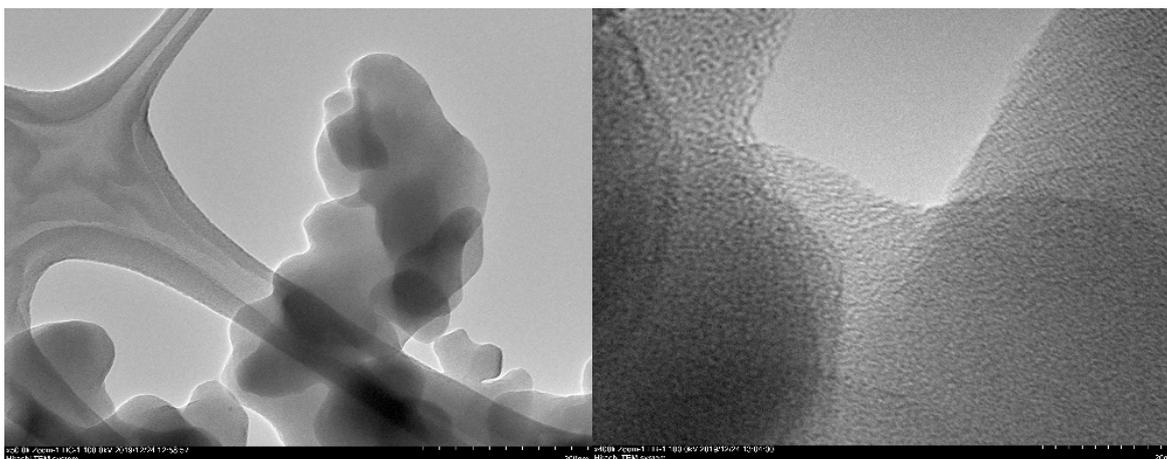


Рисунок 2. Изображение частиц ЛЦ полученное с помощью просвечивающего электронного микроскопа. Слева шкала 200 нм, справа 20 нм.

Лазерные спектроскопические методы обнаружения и отслеживания наночастиц в культивируемых ооцитах и эмбрионах.

-Определены спектральных свойств ЛЦ (С-точек) из биоматериала внутри ооцита в зависимости от параметров лазерного фемтосекундного излучения, в зависимости от материала органеллы (органеллы цитоплазмы, органеллы ядра, ядрышко).

-Определение спектров люминесценции при однофотонном возбуждении

-Определение спектров люминесценции при двухфотонном возбуждении. Определение поляризационных характеристик люминесценции. Определение характерных времен затухания люминесценции.

Показано, что ЛЦ, образующиеся внутри клетки при воздействии остросфокусированного фемтосекундного лазерного излучения, проявили себя как высокоэффективные люминесцентные центры 2-х фотонной люминесценции. Рисунок 3 демонстрирует спектры 2-х фотонной люминесценции. Показано, что форма спектров люминесценции почти совпадает для ЛЦ образованных в различных органеллах (Рис.3А). В работе был предложен гипотетический механизм образования ЛЦ (С-точек) в основе которого лежит процесс фотоионизации в сильном световом поле остросфокусированного фемтосекундного лазерного излучения и образование плазмы в области перетяжки. Близкие спектры люминесценции в центрах образовавшихся в различных по химическому составу органеллах, указывают на то, что, в плазме низкого давления формируемой лазерным излучением, исходно различные биомолекулы превращаются в близкие по составу продукты. Рис.3В показывает, что спектр 2-х фотонной люминесценции зависит от длины волны возбуждения. Методом FLIM была выявлена зависимость кинетик затухания люминесценции от длины волны возбуждения. Также наблюдается различие во временах затухания люминесценции на различных

пробных длинах волн. На основании этих наблюдений можно заключить, что полосы возбуждения и полосы люминесценции являются спектрально неоднородно уширенными полосами. Поляризационные характеристики люминесценции подтверждают этот вывод о неоднородном уширении.

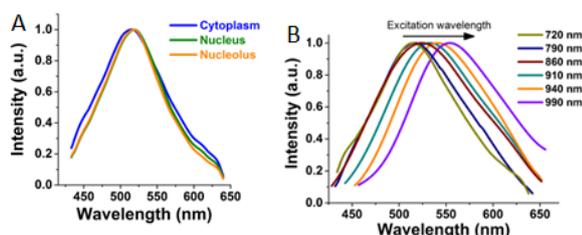


Рисунок 3. Спектры ЛЦ . А, спектры 2-х фотонной люминесценции ЛЦ образованные в цитоплазме, в ядрышке, в ядре. Зависимость спектра 2-х фотонной люминесценции в зависимости от длины волны возбуждения лазера.

- Методы наблюдения эффектов наночастиц (оценка условий для сохранения жизнеспособности объекта и наблюдения жизненных процессов (Raman, FLIM). Рамановская спектроскопия эмбрионов (рыбок Данио и мышей), определение основных характеристик для оценки качества и развития эмбриона

Алмазные наночастицы (НА) в настоящее время рассматриваются с точки зрения их применения в биологических и медицинских исследованиях, в частности как маркер для различных типов микроскопии и имиджинга, для создания биосенсоров, для направленной и контролируемой доставки лекарств и других веществ. Разработка применений НА делает актуальным исследование их взаимодействия с различными биологическими системами, разработка методов их наблюдения/визуализации в изучаемых системах и методов оценки состояния изучаемых систем.

Был проведен анализ НА на биосовместимость, эмбрионы рыбок Данио (*Danio rerio*, Zebrafish) были использованы в качестве модели. НА впрыскивались в оплодотворенные эмбрионы, наблюдалось развитие эмбрионов, локализация НА внутри эмбрионов определялась с помощью методов конфокальной флуоресцентной микроскопии и имиджинга времени жизни флуоресценции (FLIM). Флуоресценция наноалмазов, источником которой являются дефектные центры свечения в кристаллической решетке НА, в частности NV центры, позволяет наблюдать их распределение в процессе развития. Флуоресценция NV центров возбуждаемая длинами волн 488 нм – 532 нм наблюдалась в интервале длин волн 600-700 нм. Время жизни флуоресценции НА составляет доли нс, что намного меньше, чем времена жизни эндогенных флуорофоров (автофлуоресценции). На Рис. 4 сравниваются времена жизни флуоресценции НА и автофлуоресценции эмбриона. На Рис. 5 представлены изображения эмбрионов рыбок Данио через 2 часа (а) и 24 часа (б) после оплодотворения и FLIM изображения эмбрионов с впрыснутыми НА через 2 часа (в) и 24 часа (г) после оплодотворения. Было также показано, что низкие концентрации НА (до 10 мкг/мл в плазме эмбриона) являются безопасными, более высокие концентрации могут вызывать дефекты при развитии эмбриона.

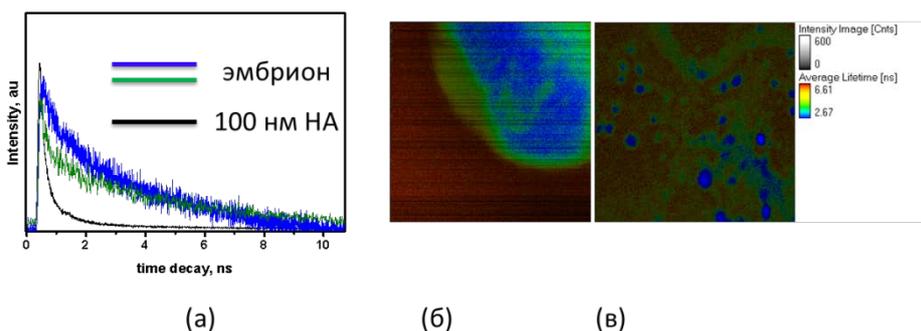


Рис. 4 (а) Времена жизни эмбриона *Danio rerio* и НА со средним размером частиц 100 нм, рассчитанные по FLIM изображениям (б) эмбриона, (в) НА на кремниевой подложке

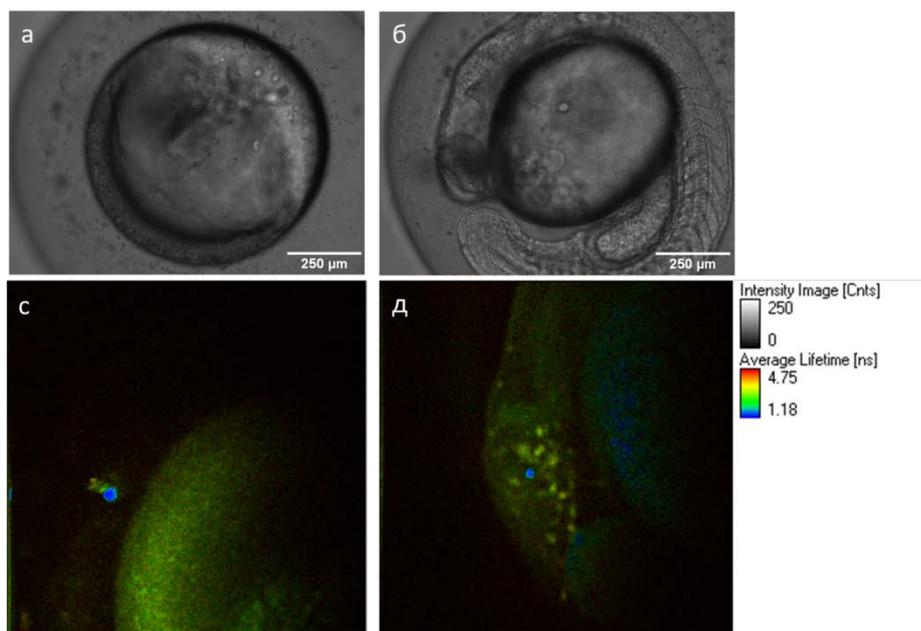


Рис. 5 Изображения эмбрионов рыбок данио через 2 часа (а) и 24 часа (б) после оплодотворения и FLIM изображения эмбрионов с впрыснутыми НА через 2 часа (в) и 24 часа (г) после оплодотворения.

Проведены начальные исследования по влиянию НА на эмбрионы млекопитающих (предимплантационные эмбрионы мышей). Использовались НА с модифицированной аминогруппами поверхностью (НА-NH₂). Нанотоксичность НА-NH₂ определялась на основании наблюдения за развитием эмбрионов *in-vitro* (до стадии бластоцисты). Отметим, что аминированные НА представляют интерес как частицы для конъюгации и доставки лекарств, а также как модельные частицы для разработки методики эмбриональной нанотоксичности. Морфологический анализ развития эмбрионов показал, что при низкой концентрации наночастиц в культуральной среде НА-NH₂ не оказывает статистически значимого эффекта при развитии эмбрионов вплоть до стадии бластоцисты по сравнению с контролем (без воздействия НА). Взаимодействие НА-NH₂ с эмбрионами мыши могло быть визуализировано с помощью FLIM. Не наблюдалось проникновения НА через зону пеллюцида.

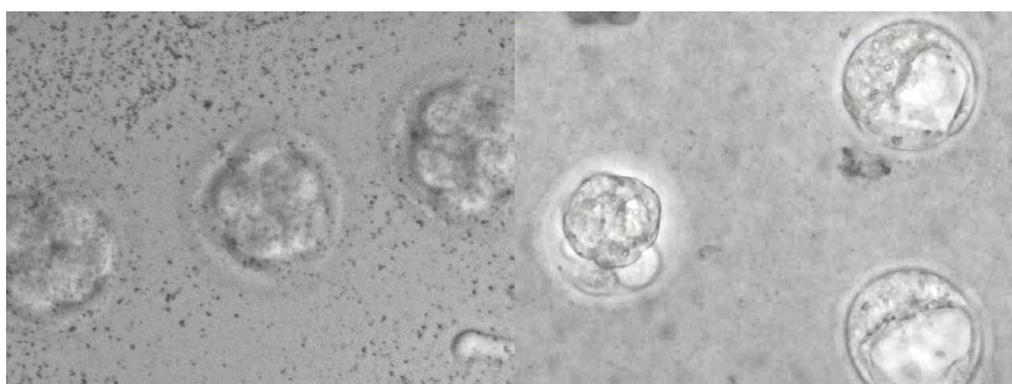


Рис. 6. Инкубация ранних эмбрионов с НА. Нормальное развитие до стадии бластоцисты

Исследуется возможность анализа воздействия наночастиц на ранние эмбрионы млекопитающих с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния.

Спектроскопия комбинационного рассеяния (Рамановское рассеяние) является одним из лазерных спектроскопических методов, которые могут быть универсальными инструментами при исследовании структуры эмбрионов млекопитающих на ранней стадии и биохимических процессов в живых ооцитах и эмбрионах. Ограничивающим фактором использования лазерных методов в эмбриологических исследованиях может являться влияние лазерного облучения. В работе подобраны комбинации параметров

лазерного воздействия при спектроскопии комбинационного рассеяния (Рисунок 7), безопасные для изучения живых ранних эмбрионов *in vitro* без влияния на их способность к развитию до стадии морфологически нормальной бластоцисты: мощность лазера, длина волны, время экспозиции. Используя найденные условия эксперимента получены спектры комбинационного рассеяния от различных областей эмбрионов мыши. Проанализированы спектры, полученные при разных длинах волн возбуждения. Предлагаются и обсуждаются критерии оценки состояния живого эмбриона на основе анализа спектров комбинационного рассеяния, измеренных при разных длинах волн возбуждения. Оценка жизнеспособности эмбрионов после лазерного воздействия, которое было оказано при записи Рамановских спектров, была сделана на основе анализа морфологических признаков эмбриона развившегося до стадии бластоциста. Как видно из Рисунок 7 2-х клеточный эмбрион развивается бластоцисты после лазерного облучения при канировании рамановского спектра.

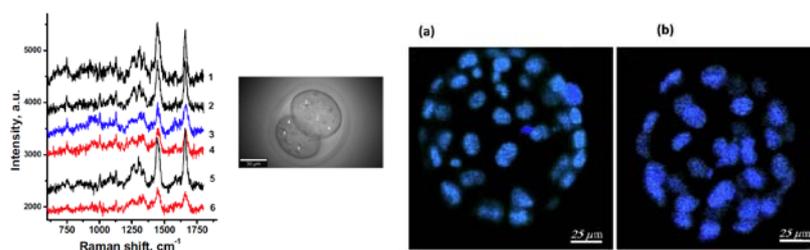


Рисунок 7. Два изображения слева. Рамановская спектроскопия живых 2-х клеточных эмбрионов. (а) спектры получены с различных областей эмбриона: 1, 2, 5 (темная цитоплазма); 3 (ядро, нуклеоплазма); 4, 6 (светлая цитоплазма). Возбуждением на длине волны 532 нм; мощность в фокальной плоскости 3 mW, 60x объектив; время сканирования спектра 40 sec. (б) Точки сканирования в живом 2-х клеточном эмбрионе. Два изображения справа. Оценка способности развития 2-х клеточного эмбриона *in vitro* до стадии бластоциста после облучения лазером и съемки рамановского спектра. 2-х фотонное флуоресцентное изображение (а) контроль, (б) образец после съемки спектра. Краситель Hoechst33342 (для визуализации ядер) 72 часа *in vitro* культивации 2-х клеточных эмбрионов. 2-х фотонное возбуждение красителя 740 nm фемтосекундным лазером.

Для дальнейшего развития проекта была разработана методика детального определения морфологии ооцита и его химического состава (3D карты химического состава) методами масс-спектропии TOF-SIMS. Рисунок 8 демонстрирует полученное 3D распределение отдельных функциональных групп в ооците. Мы надеемся, что этот подход позволит в дальнейшем определить не только морфологические изменения, которые можно наблюдать методами оптической микроскопии, но и изменения 3D карты химического состава.

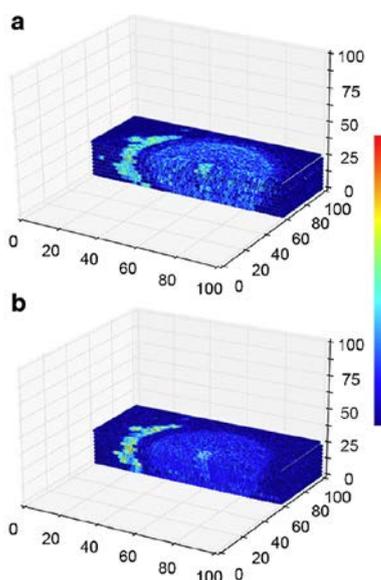


Рисунок 8. Послойная реконструкция GV ооцита мыши в представлении: а) распределения иона m/z 26(CN⁻). б) m/z 79 (PO3⁻). Размеры представлены в μm . 3D получено из 12 срезов с шагом срезки 2- μm .

С использованием двухфотонной флуоресцентной микроскопии была разработана методика определения трека ЛЦ по мере развития ооцита. На рисунке 9 показан трек ЛЦ, сформированного в ядре GV ооцита, по мере развития ооцита и прохождения стадии разрушения зародышевого пузырька (germinal vesicle breakdown, GVB). Из анализа этой траектории были выявлены стадии нормальной диффузии ЛЦ (Рисунок 9В), стадия активной диффузии и субдиффузии (Рисунок 9С). Результат этих опытов демонстрирует принципиальную возможность использовать генерируемые ЛЦ для определения динамики морфологических изменений в развивающейся клетке. В дальнейших опытах с изучением трекинга ЛЦ мы попытаемся дать ответ на вопрос - отвечает трек ЛЦ траектории фрагмента органеллы, в котором был образован ЛЦ, или ЛЦ отрывается от места образования и его движение обусловлено закономерностями движения не связанного с органеллой зонда.

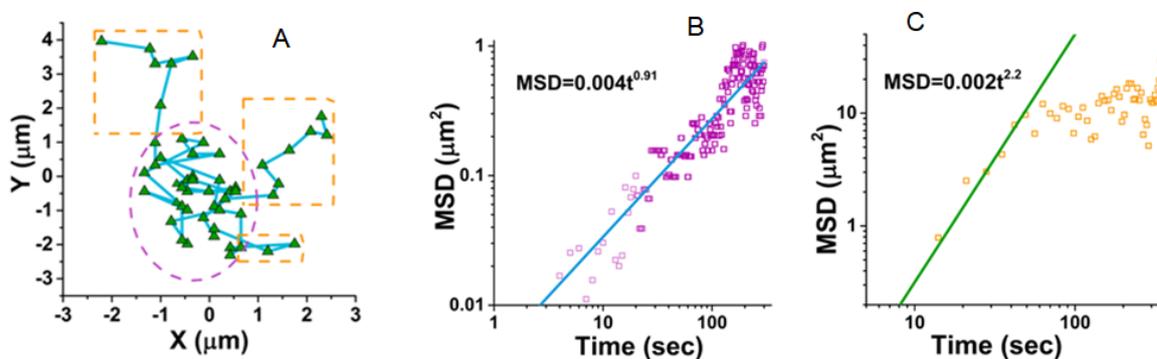


Рисунок 9. (А) Траектория ЛЦ в нуклеоплазме GV ооцита по мере созревания ооцита до МІ стадии. Область, отмеченная пунктирным квадратом, относится к траектории с активной диффузией. Область, отмеченная пунктирным эллипсом, относится к ограниченной диффузии. (В) (Means square displacement - MSD) среднеквадратичное смещение как функция времени ЛЦ в ядре. (С) MSD стадии активной диффузии ЛЦ в ядре. На времени наблюдения более ~ 40 сек отмечается переключение активной диффузии на режим субдиффузии.

- Методы анализа фемтосекундного лазерного воздействия для исследований *in vitro*:

Инвазивность лазерного воздействия оценивали на основании статистического анализа выживаемости ооцитов. Выживаемость ооцитов определяли по: 1) способности GV ооцита к созреванию до стадии метафаза II и образованию направительного тельца; 2) способности к развитию ооцита после инициирования искусственного партеногенеза; 3) способности к развитию эмбриона и анализу морфологических особенностей сформировавшихся бластоцист. Эти статистические данные собираются и анализируются при проведении практически всех опытов, в том числе и тех, в которых определение инвазивности не является главной целью. Было показано, что существует интервал параметров лазерного облучения (мощность импульса, длительность пакета импульсов, экспозиция облучения) при котором можно создать ЛЦ (С-точки) в определенном месте ооцита/эмбриона мыши без существенного снижения вероятности развития.

Корректировка плана исследований на следующий период реализации проекта

Определение механизма образования С-точек из биоматериала клетки в интенсивном световом поле остросфокусированного фемтосекундного лазера. Использование модельных химических и биологических

систем в качестве субстрата для формирования точек. Подготовка и публикация научных статей по этой теме.

Определение химического состава C-точек методами масс-спектропии вторичных ионов (TOF-SIMS, time of flight secondary ions mass-spectroscopy, электронной микроскопии). Подготовка и публикация научных статей по этой теме.

Изучение возможности использования люминесцентных центров (C-точек) в качестве оптических наносенсоров для выявления физико-химических и вязкоупругих свойств окружающей клеточной среды. В этом направлении необходимо развить методики видео фиксации трека люминесцентных меток в клетке, определить влияние на спектральные характеристики C-точек физико-химических параметров среды (рН и др.)

Развитие методов определения внутриклеточного трекинга из анализа видеофайлов, определение путей массопереноса биоматериала в процессе развития эмбриона. Подготовка и публикация научных статей по этой теме.

Определение возможностей использования алмазных наночастиц в качестве наноконтейнеров для целевой доставки биоактивных веществ внутрь клетки с использованием твизеров, в том числе и фемтосекундных твизеров. Подготовка и публикация научных статей по этой теме.