

# Создание функциональных силикатных наночастиц на основе комплексов лантанидов и возможности их использования в биоанализе.

С.В.Федоренко, А.Р.Мустафина, А.Р. Мухаметшина,  
К.А. Петров, М.Е. Жилкин, М.А. Шестопалов, Т. Массон.

ИОФХ КНЦ РАН  
КПФУ  
ИНХ СО РАН

Работа выполняется в рамках проекта

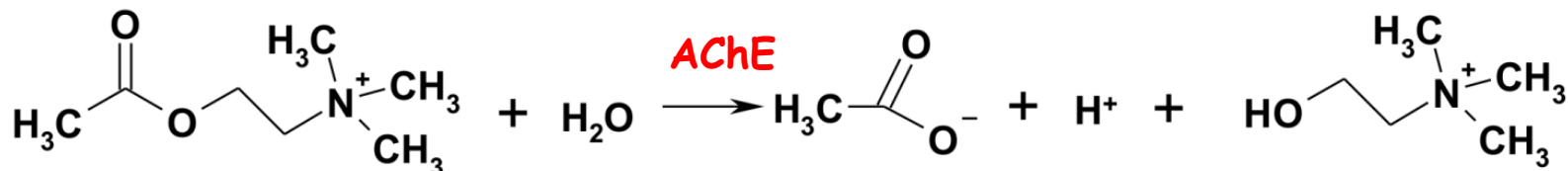
РНФ 14-50-00014 по направлению:

СИНАПТИЧЕСКАЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗА КАК МИШЕНЬ  
ДЛЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ,  
ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ  
ЦЕНТРАЛЬНОЙ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ  
СИСТЕМЫ

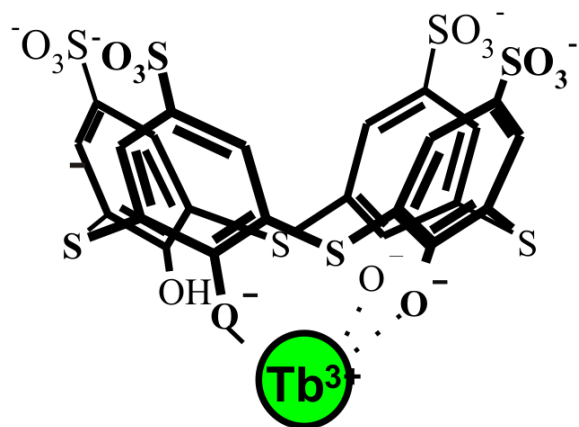
Мониторинг энзиматического гидролиза ацетилхолина в синаптической щели является важной биохимической проблемой, которая направлена на определение активности холинэстеразы в ответ на внешние раздражители в условиях *ex vivo*.

**AChE**- ацетилхолинэстераза

Гидролиз ацетилхолина



Tb-TCAS



- 1) Высокая устойчивость,  $\text{Log}\beta=11$
- 2) Интенсивная pH-зависимая Tb(III)-люминесценция;
- 3) Время жизни порядка  $\tau=0.73$  мсек;
- 4) Большой Стоксов сдвиг;
- 3) TCAS как "антенна" для Tb(III)-люминесценции

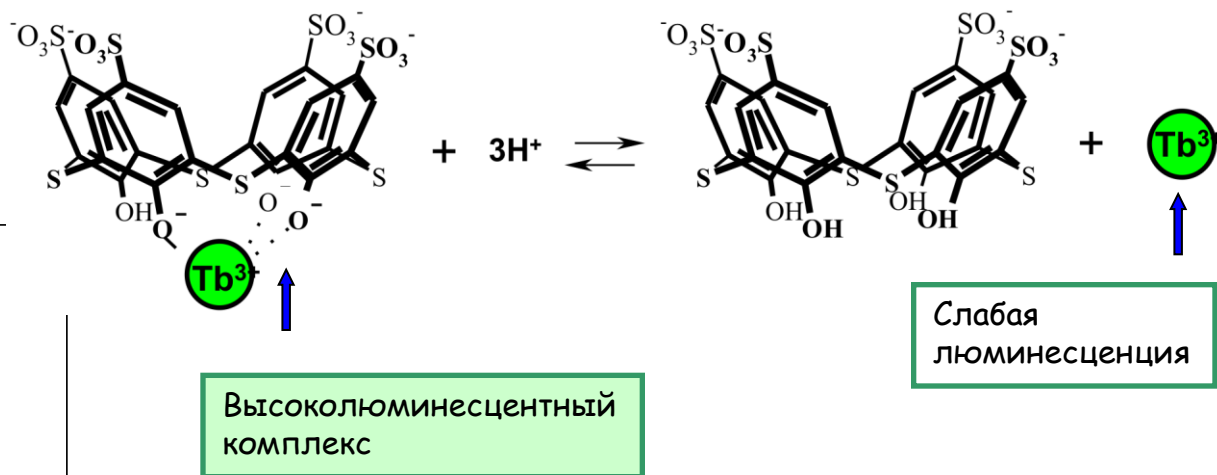
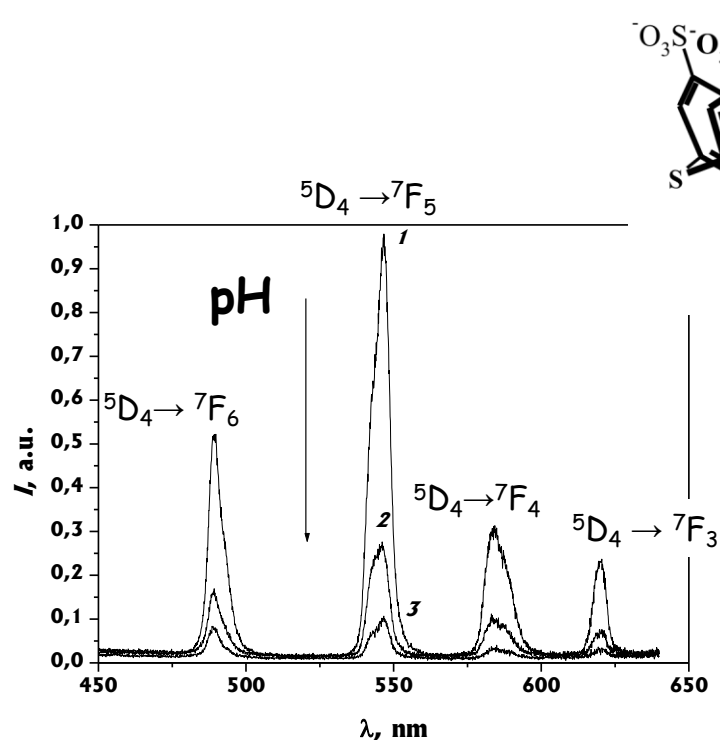
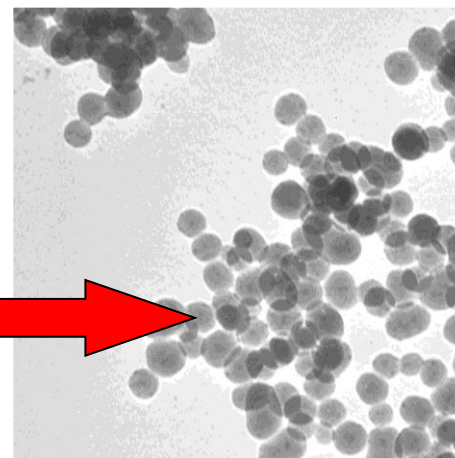
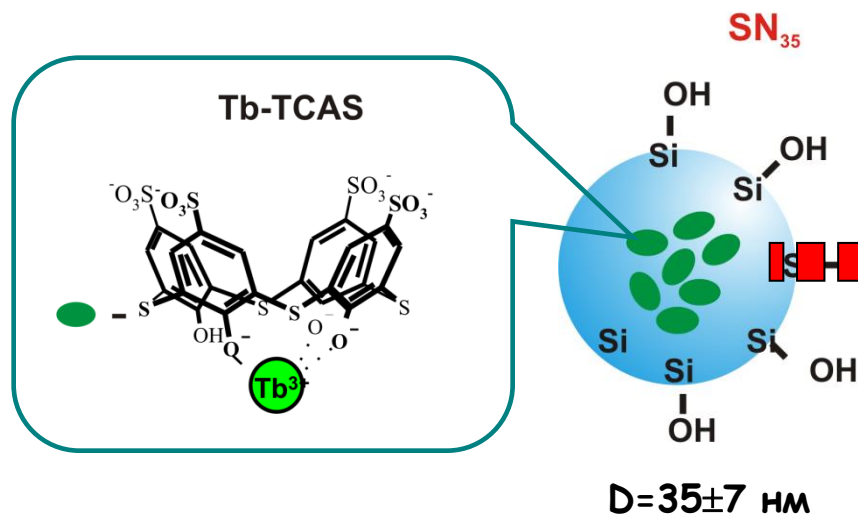


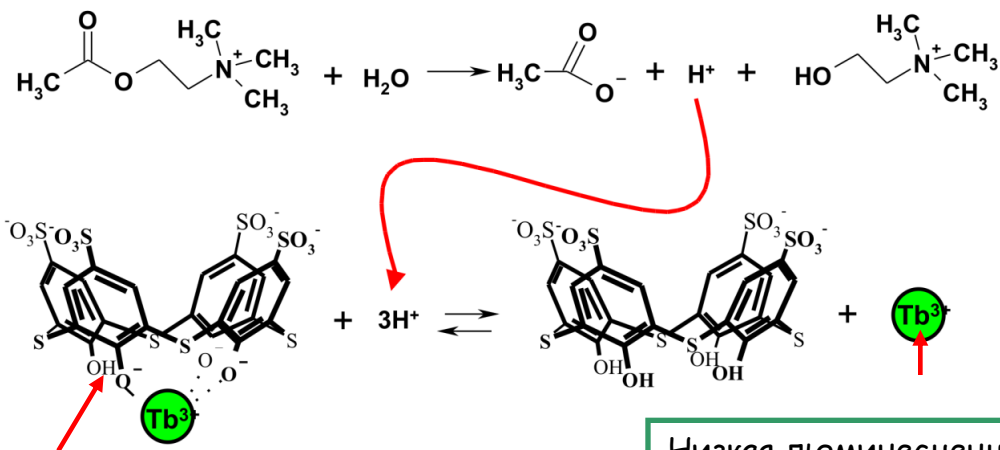
Рис.1. Эмиссионные спектры Tb(III)-TCAS комплекса в воде в отсутствие (1) и в присутствии HCl (2-3),  $\lambda_{\text{ex}}=330$  нм

# Что было сделано нами ранее

5



## Гидролиз ацетилхолина



## pH-зависимость спектров эмиссии Tb-TCAS допированных силикатных частиц

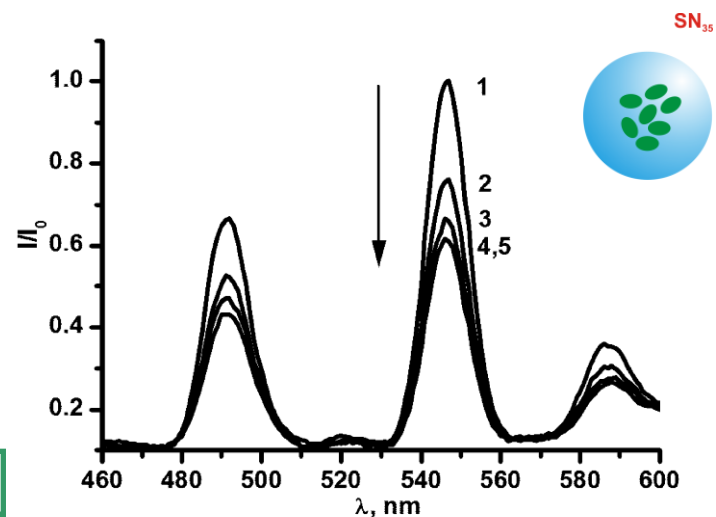
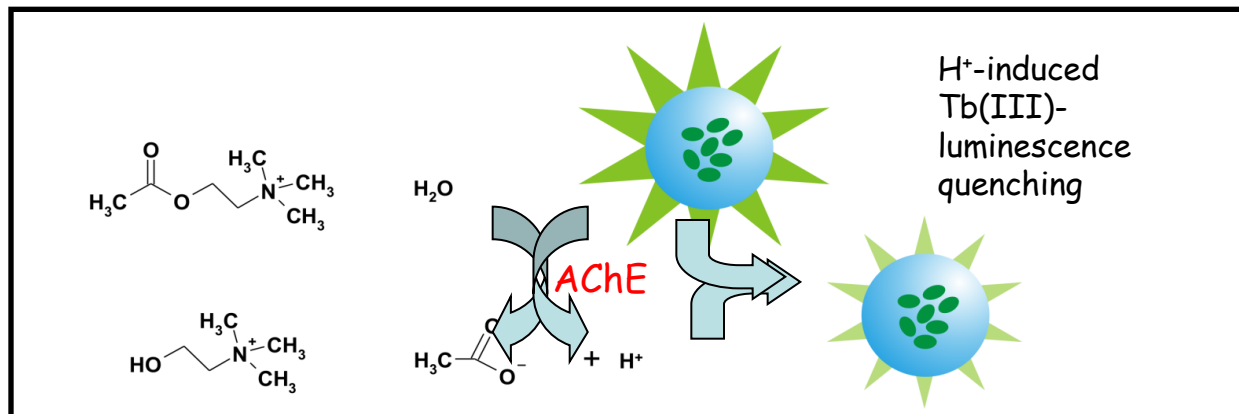
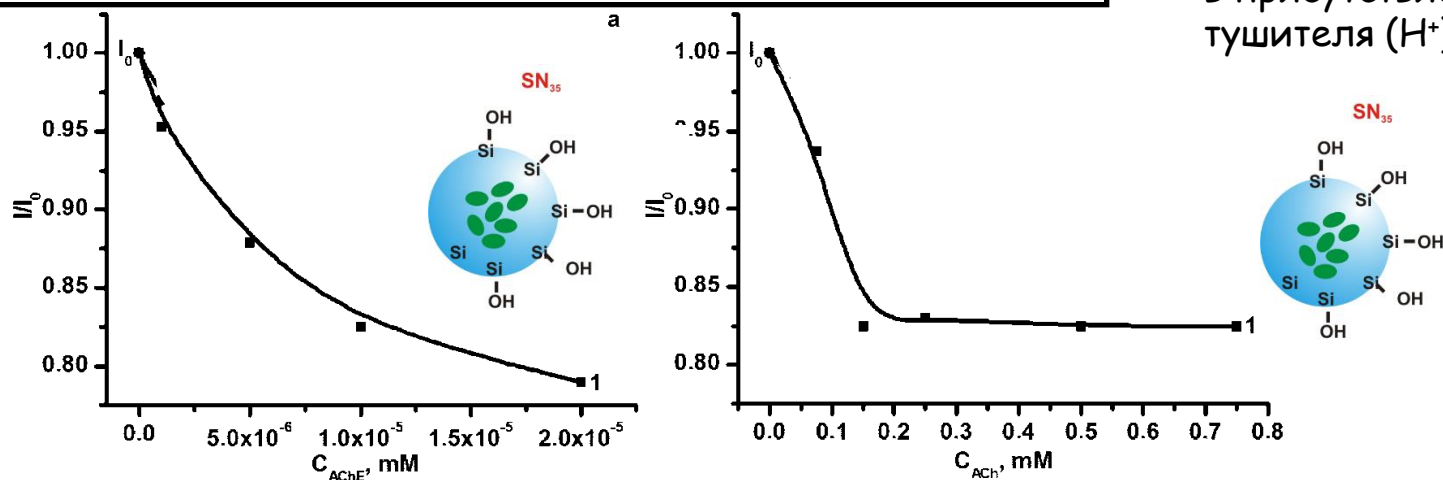


Рисунок 2. (а) Спектры эмиссии  $SN_{35}$  (1) и в присутствии  $CH_3COOH$  (2-5)

## ЭФФЕКТ ЭНЗИМАТИЧЕСКОГО ГИДРОЛИЗА АЦЕТИЛХОЛИНА НА ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ Tb(III)-СИЛИКАТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

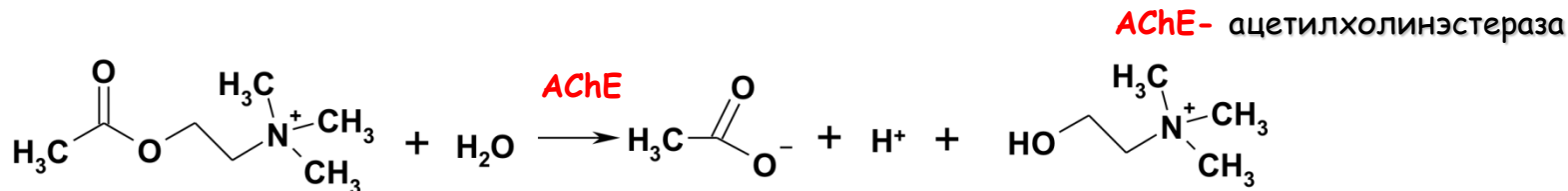


$I_0$  и  $I$ -  
интенсивности  
Tb(III)-  
люминесценции  
(при 545 нм) без и  
в присутствии  
тушителя ( $H^+$ )



**Рисунок 3.** (а) Зависимость  $I/I_0$  для  $SN_{35}$  от концентрации ацетилхолинэстеразы при постоянной концентрации ацетилхолина (0.15 mM ACh);

(б) Зависимость  $I/I_0$  для  $SN_{35}$  от концентрации ацетилхолина ACh при постоянной концентрации ацетилхолинэстеразы  $10^{-8}$  M AChE,  $SN_{35} = 0.05$  г  $л^{-1}$ , NaCl (100 mM). Начальная pH = 8.5,  $t = 5$  мин



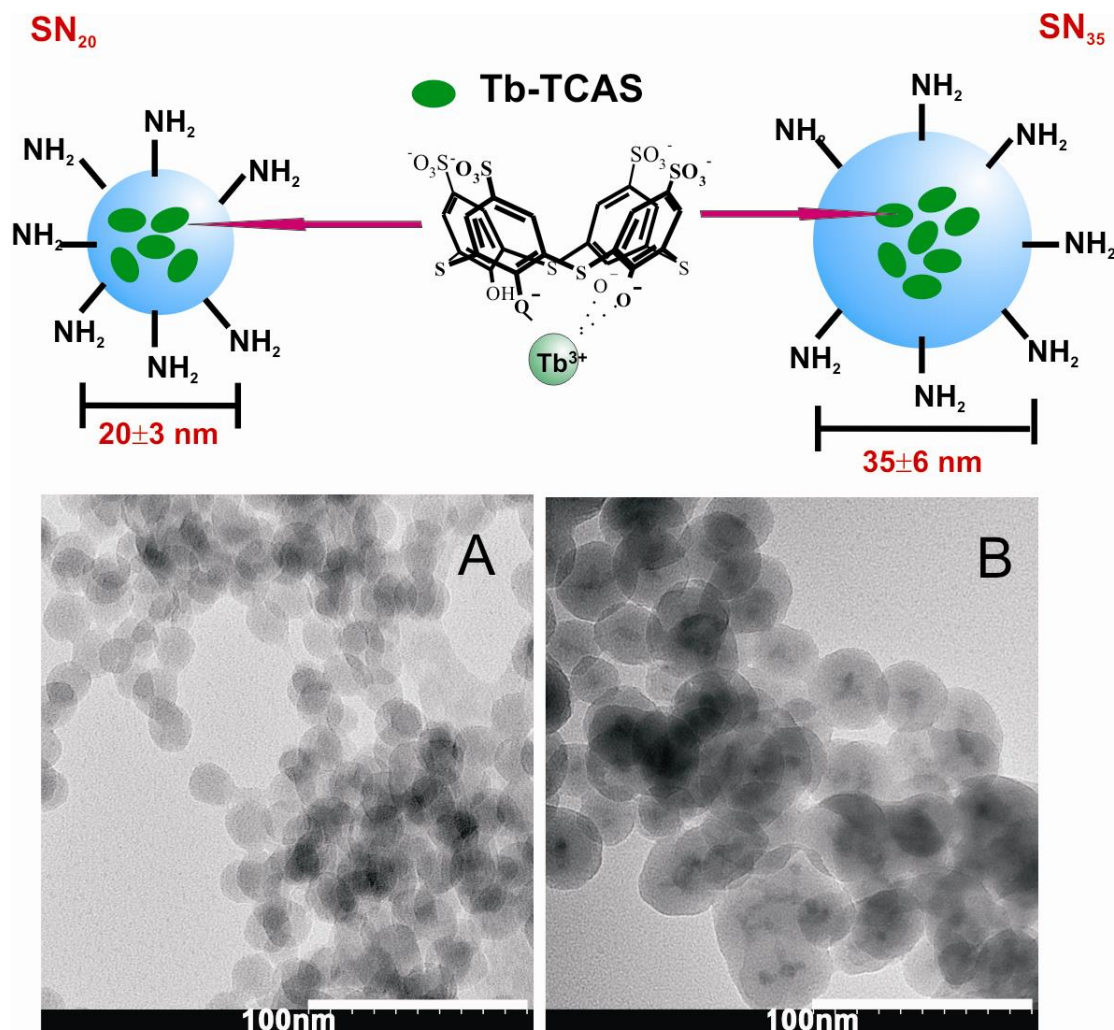
## Основные требования к таким наносенсорам:

1. Способность с высокой чувствительностью «откликаться» на небольшие изменения pH (не более 0.1 единиц) в диапазоне 8-6 единиц pH;
2. Размер не выше 20 нм;
3. Низкая цитотоксичность;
4. Функционализация наносенсоров белком-мишенью ( $\alpha$ -бунгаротоксином).

Цель работы - 1) синтез наноразмерного сенсора для мониторинга энзиматического гидролиза ацетилхолина непосредственно в синаптической щели;

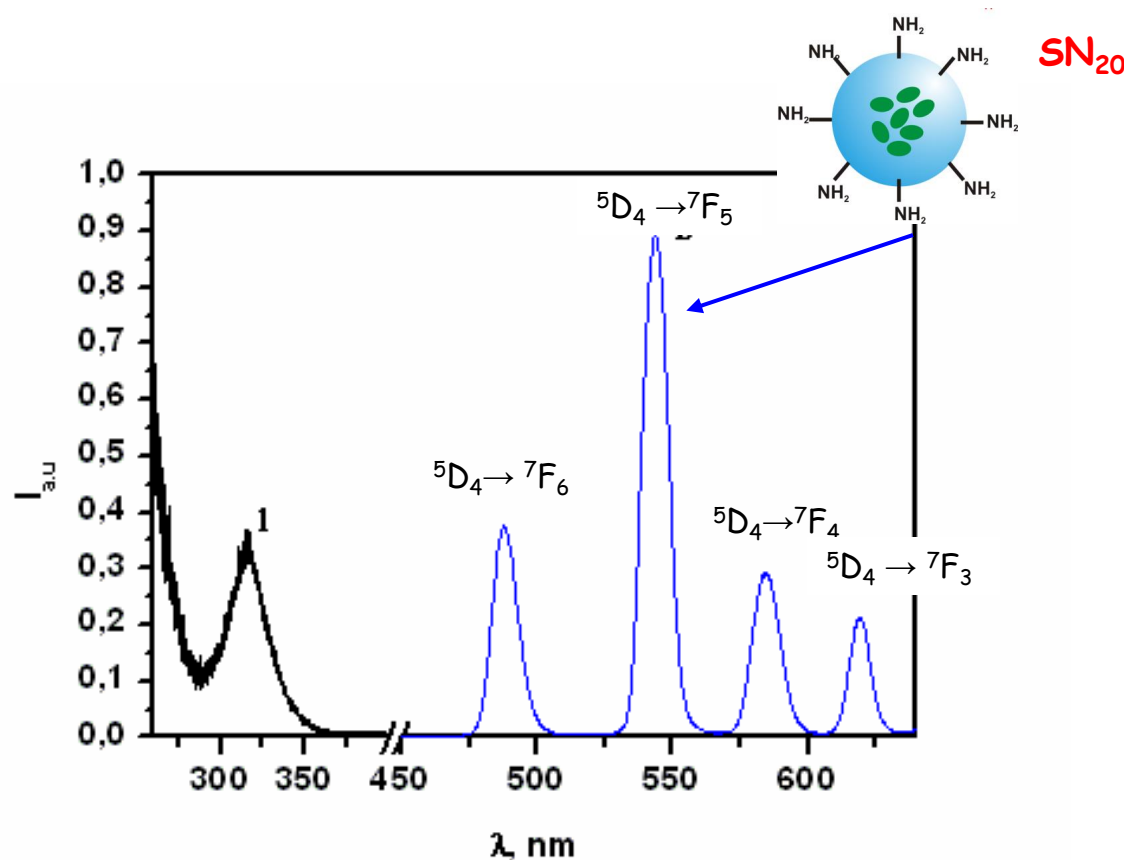
2) определение цитотоксичности и проверка применимости Tb(III) допированных наночастиц как клеточных маркеров в конфокальной лазерной флуоресцентной микроскопии.

# ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ



**Рис. 4.** Схематичное изображение аминосиликатных наночастиц, допированных комплексами [Tb(TCAS)] (SN<sub>20</sub> и SN<sub>35</sub>), и их фото (ПЭМ)

# Фотофизические свойства силикатных частиц $SN_{20}$



## Преимущества:

- Легкий синтез;
- Хорошая монодисперсность;
- **Стабильная зеленая** люминесценция в течение нескольких месяцев;
- **Низкий выход** [Tb(TCAS)] комплексов из силикатной матрицы (2-5%);

Рис. 5. Спектры возбуждения (1) ( $\lambda_{эм}=489$  нм) и эмиссии ( $\lambda_{возб}=330$  нм) водной дисперсии  $SN_{20}$ .

Для  $SN_{35}$  спектры эмиссии и возбуждения аналогичны

# Агрегационные и фотофизические свойства частиц $SN_{20}$ и $SN_{35}$ в различных средах

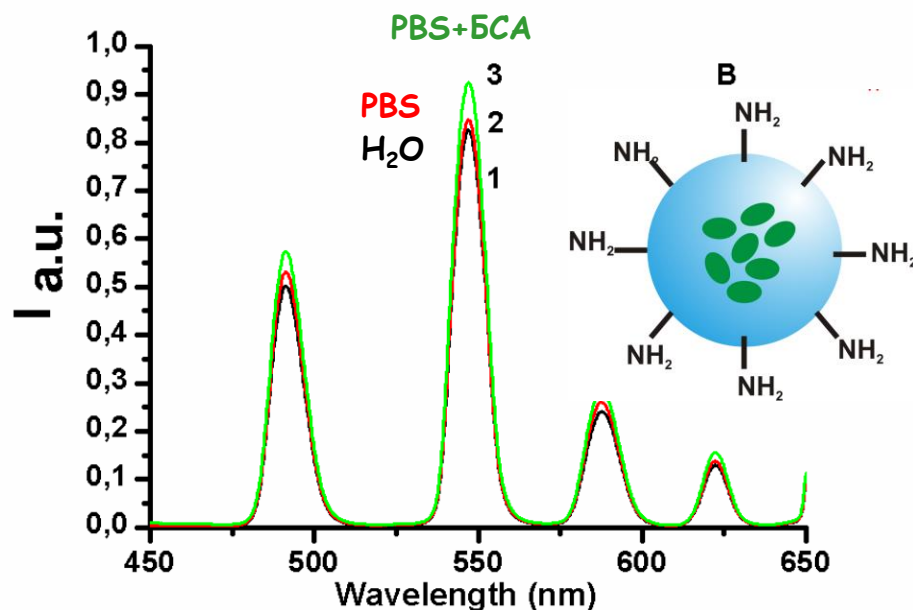
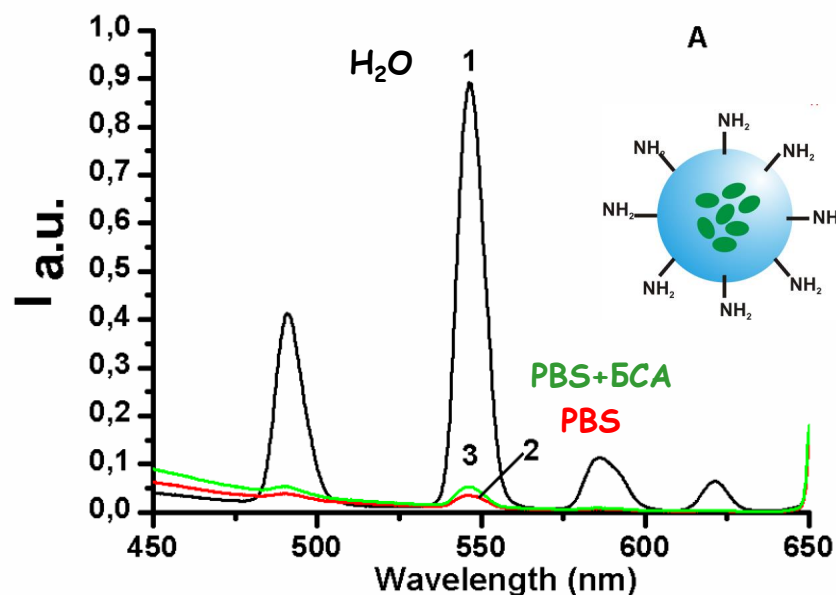
10

**Таблица 1.** Данные метода динамического светорассеяния для  $SN_{20}$  и  $SN_{35}$  в PBS и PBS-BCA растворе ( $pH=7.4$ ,  $C_{SNs}=0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $C_{PBS}=0.1 \text{ M}$ ,  $C_{BCA} = 1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ ).

	Средний гидродинамический диаметр, D, нм	ПДИ	$\zeta$ , мВ
$SN_{20}$ + Фосфатный буфер	$1398 \pm 281$	$0.43 \pm 0.04$	$-15 \pm 5.0$
$SN_{20}$ + Фосфатный буфер + BCA	Примерно $787 \pm 179$	$\sim 0.9$	$\sim -3$
$SN_{35}$ + Фосфатный буфер	$3688 \pm 154$	$0.46 \pm 0.03$	$-11 \pm 3$
$SN_{35}$ + Фосфатный буфер + BCA	$2857 \pm 72$	$0.51 \pm 0.03$	$-15 \pm 1$

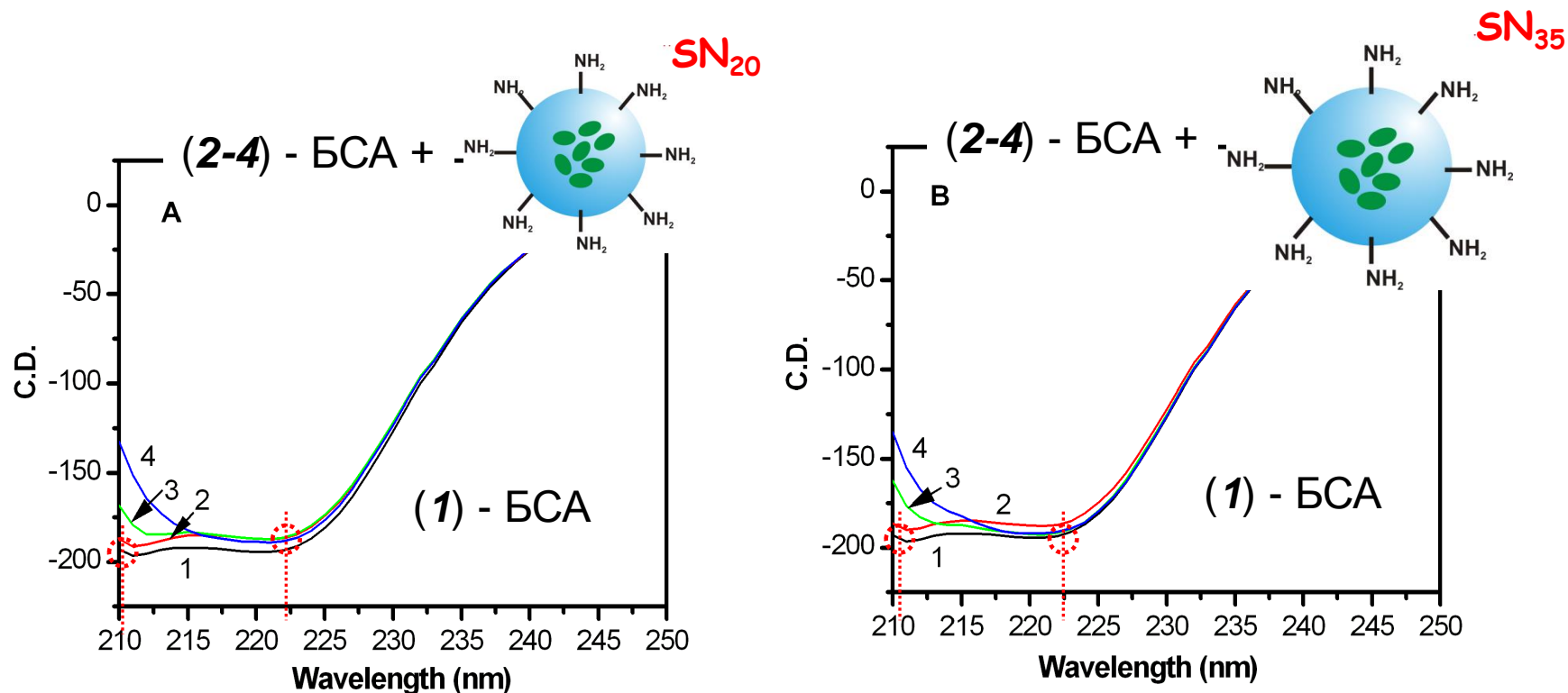
PBS - фосфатный буфер

BCA - бычий сывороточный альбумин



**Рис. 6.** Спектры эмиссии дисперсий  $SN_{20}$  (A) и  $SN_{35}$  (B) в воде (1), в PBS (2) и PBS-BCA растворе (3), где  $C_{SNs} = 0.05 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ ,  $C_{PBS}=0.1 \text{ M}$ ,  $C_{BCA} = 1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  при  $pH = 7.4$ .

Как взаимодействует белок (бычий сывороточный альбумин - БСА) с поверхностью частиц  $SN_{20}$  и  $SN_{35}$ ?



**Рис.7.** Спектры кругового дихроизма БСА  $0.025 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  (1), БСА  $0.025 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  в присутствии частиц SNs в концентрации  $0.01 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  (2), БСА  $0.025 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  и SNs  $0.1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  (3), БСА  $0.025 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  и SNs  $0.2 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  (4), (A) -  $SN_{20}$ , (B) -  $SN_{35}$ ,  $C_{\text{PBS}} 0.1 \text{ M}$ .

КД спектр БСА соответствует вторичной структуре белка  $\alpha$ -спираль.

# Цитотоксичность частиц $SN_{20}$ и $SN_{35}$

Нер-2 - линия клеток аденокарциномы гортани человека

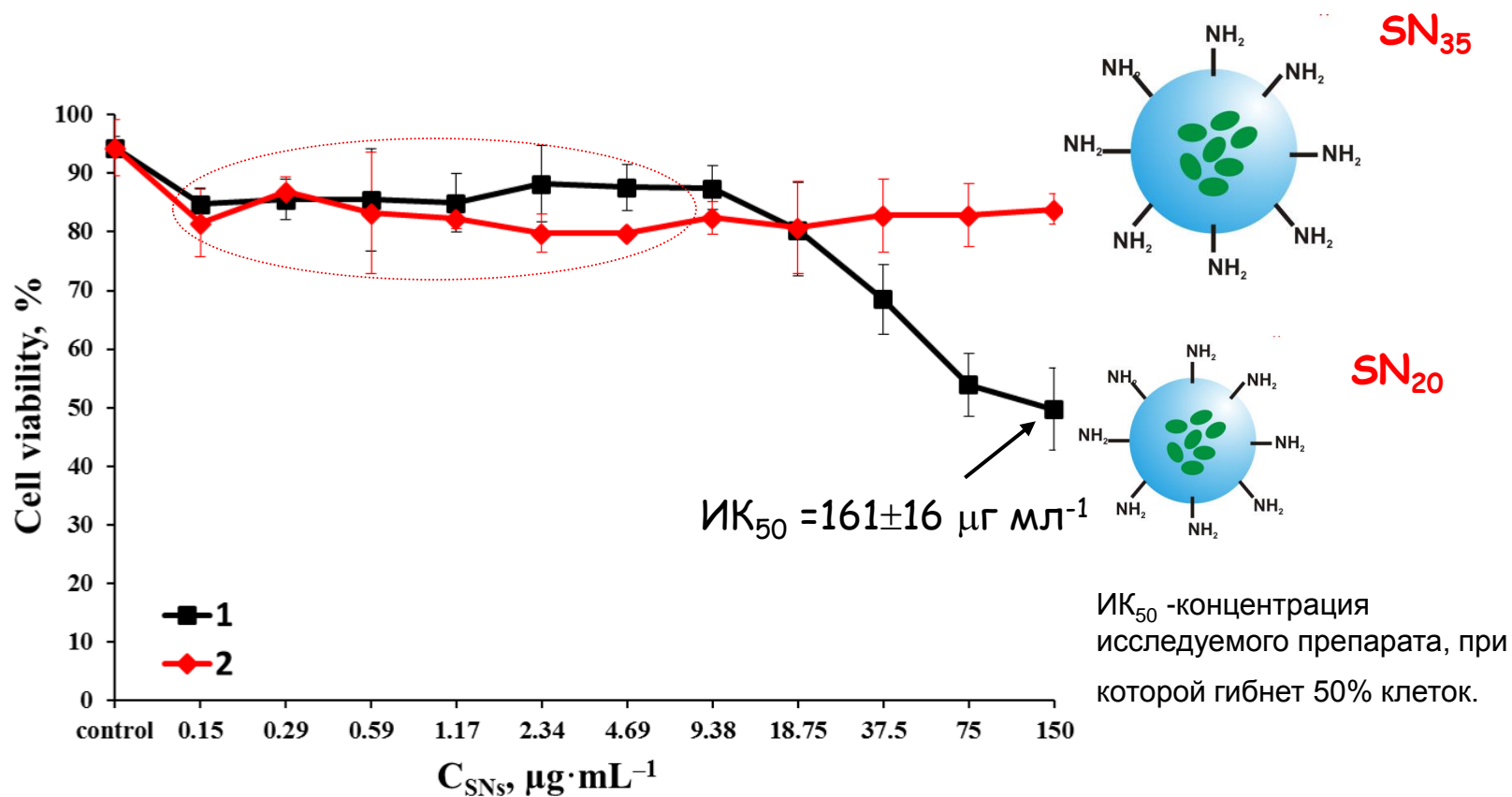


Рис. 8. Жизнеспособность Нер-2 клеток, инкубированных с  $SN_{20}$  (1) и  $SN_{35}$  (2) в течение 72 часов (MTT тест, 37°C).

# Кинетика проникновения частиц $SN_{20}$ и $SN_{35}$ в клетки линии Hep-2 (данные проточной цитометрии)

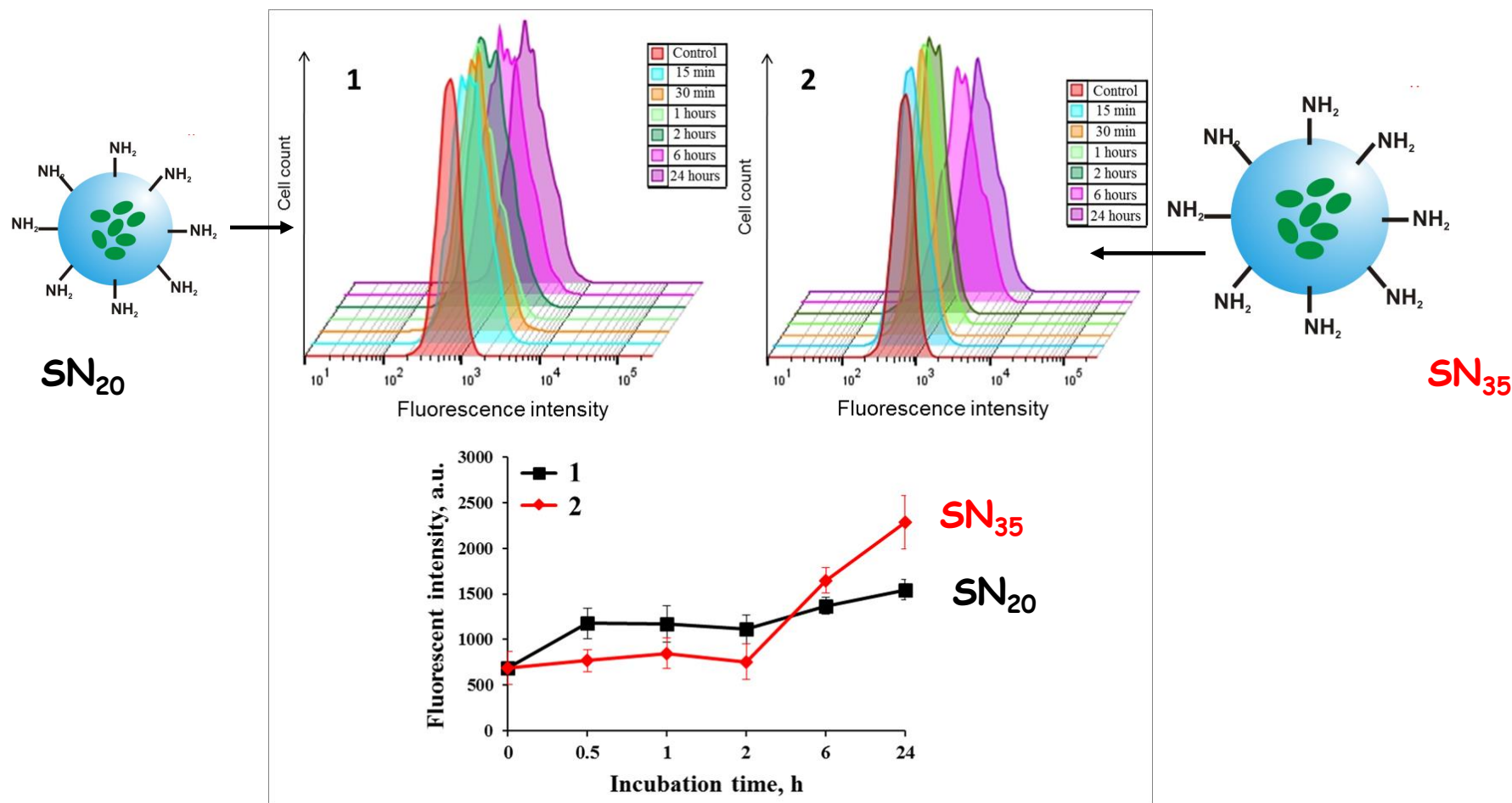


Рис. 9. Кинетика проникновения  $SN_{20}$  и  $SN_{35}$  в клетки линии Hep-2. Гистограмма (проточная цитометрия) демонстрирует изменение интенсивности люминесценции клетки после инкубации с  $SN_{20}$  (1) и  $SN_{35}$  (2) как функция от времени.

# Проникновение силикатных наночастиц $SN_{20}$ и $SN_{35}$ в клетки линии Нер-2 (конфокальная микроскопия)

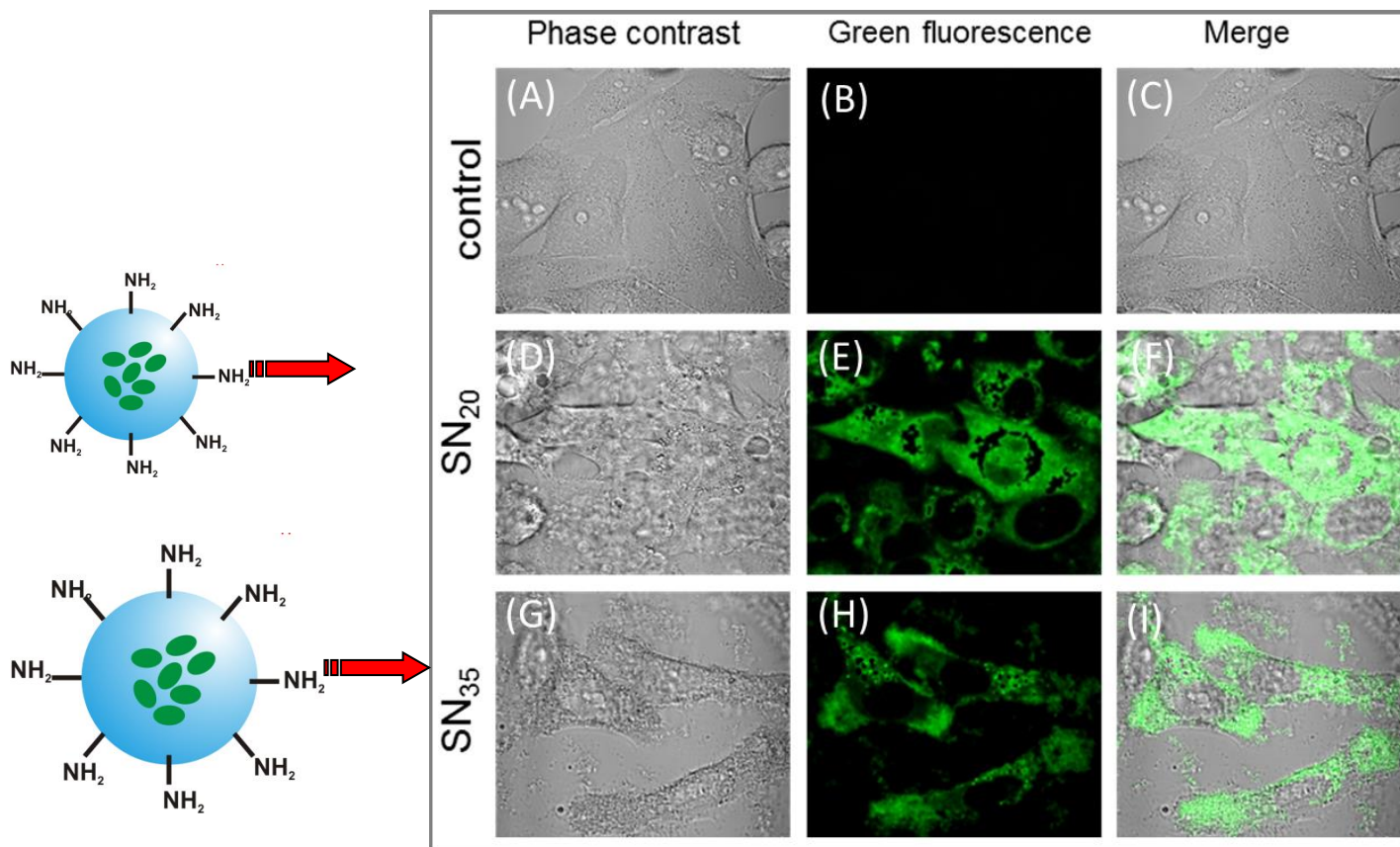


Рис. 10. Изображения, полученные с помощью конфокальной микроскопии **Нер-2** клеток (А, В, С) и **Нер-2** клеток, инкубированных с  $SN_{20}$  (D, E, F) и  $SN_{35}$  (G, H, I), в течение 12 часов, где А, D, G- фазовый контраст, В, Е, Н - флуоресценция зеленого канала, С, F, I - наложение фазового контраста и флуоресценции зеленого канала ( $\lambda_{ex}=405$  нм)

# Проникновение силикатных наночастиц $SN_{20}$ и $SN_{35}$ в клетки линии Нер-2 (ПЭМ)

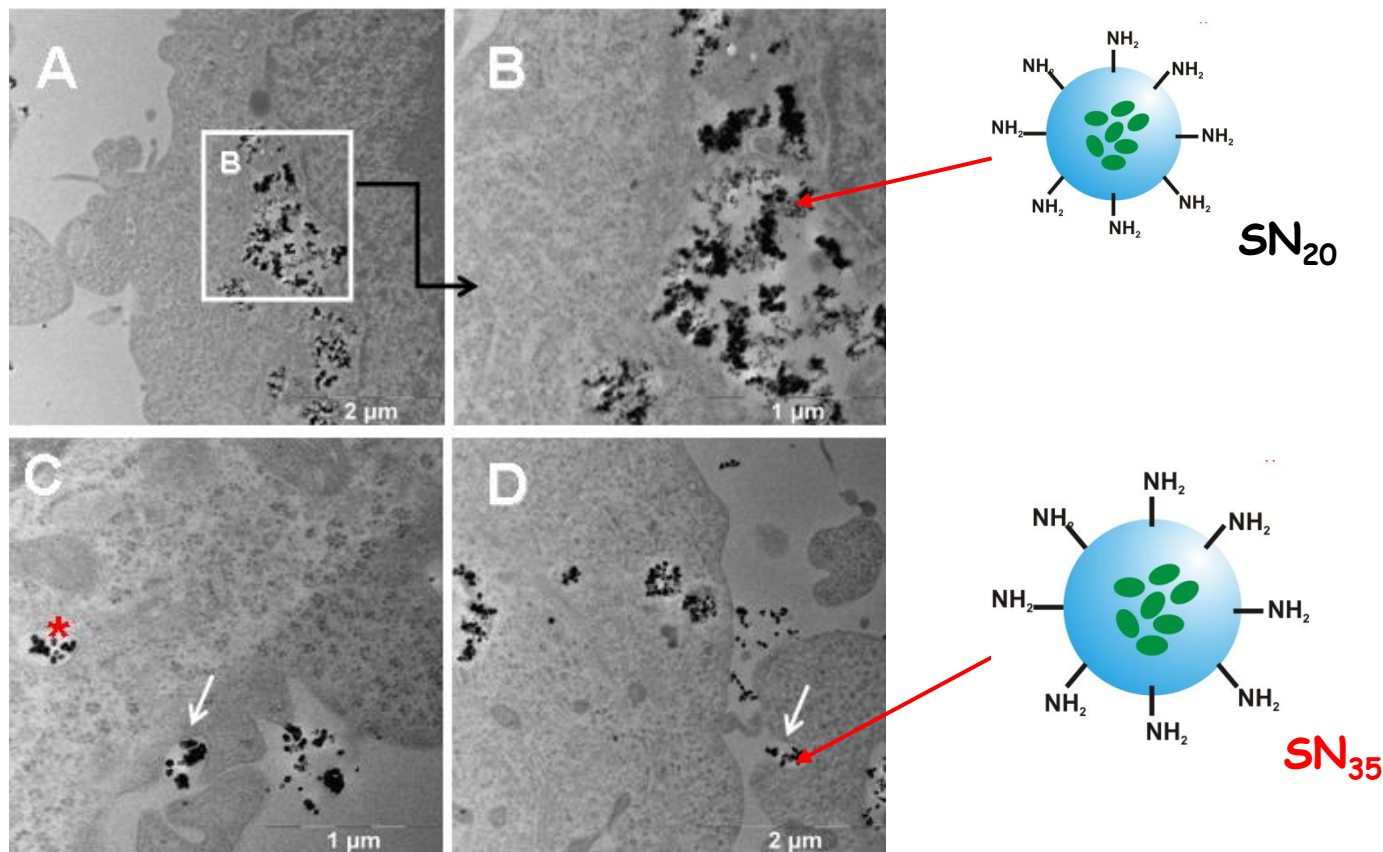
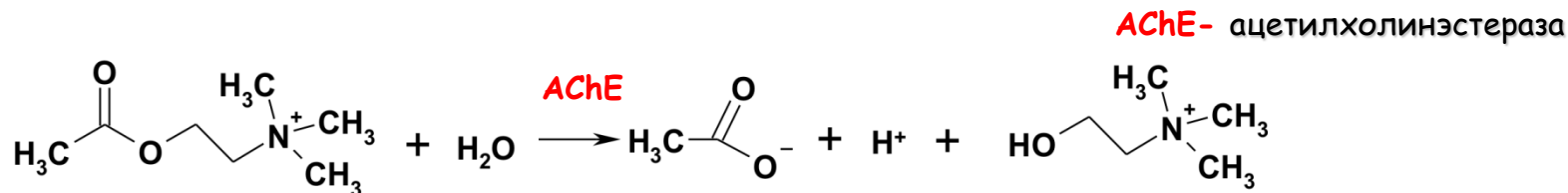


Рис. 11. Изображения ультратонких срезов Нер-2 клеток, инкубированных с  $SN_{20}$  (A, B) и  $SN_{35}$  (C, D) (Просвечивающая электронная микроскопия). Белой стрелкой помечены наночастицы, захваченные клеточной мембраной; красной звездочкой помечены наночастицы в эндосомах.

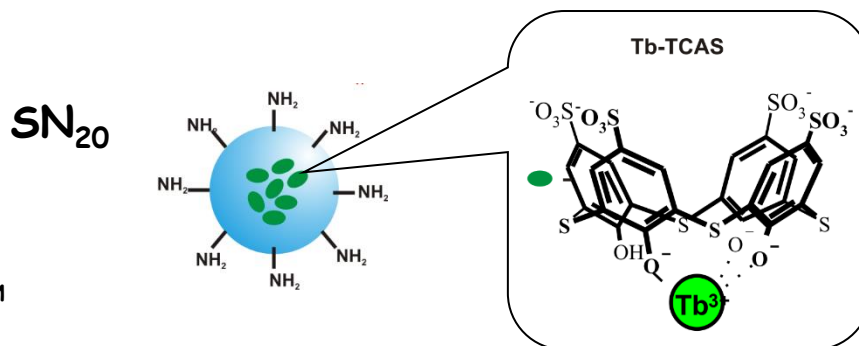
Таким образом,

**оба типа аминосиликатных частиц  $SN_{20}$  и  $SN_{35}$**

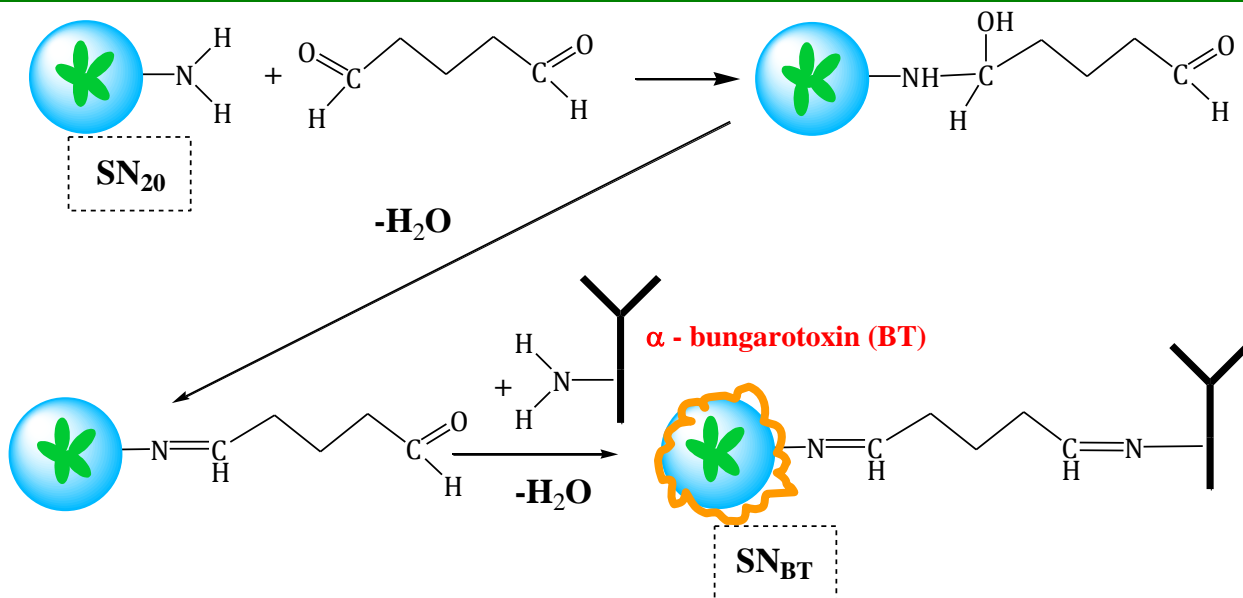
- 1) имеют интенсивную люминесценцию в зеленой области спектра;**
- 2) образуют крупные агрегаты в биологических жидкостях;**
- 3) однако их агрегация не препятствует проникновению наночастиц в клетки;**
- 4) имеют низкую цитотоксичность, сопоставимую с "пустыми" силикатными частицами.**



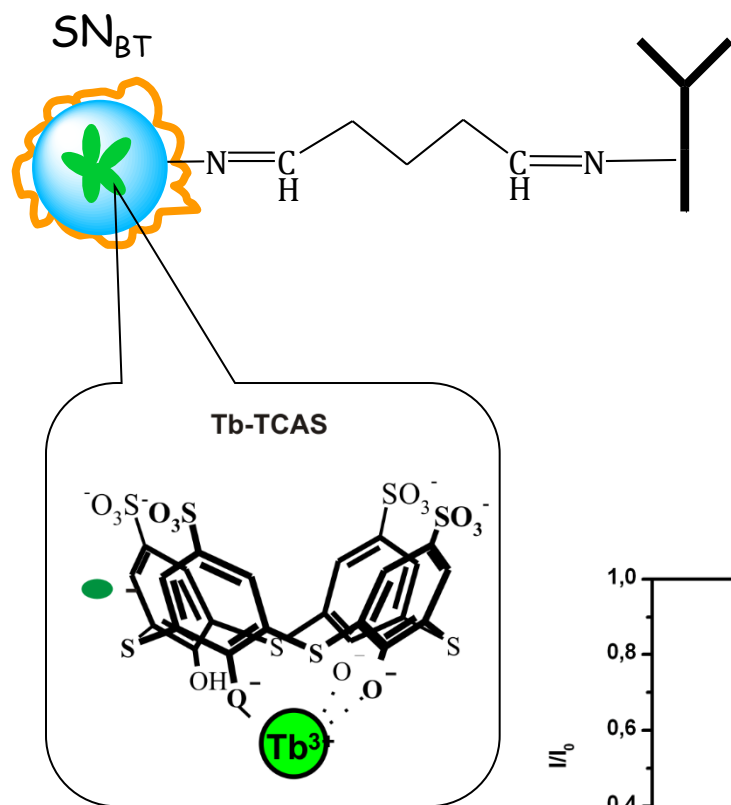
$\approx 3700$   $\text{NH}_2$ -групп на  
силикатной поверхности



## Стандартный протокол биоконъюгации полимерных частиц



# Возможности использования $\alpha$ -бунгаротоксин-модифицированных наночастиц в ферментативном гидролизе ацетилхолина



## Гидролиз ацетилхолина

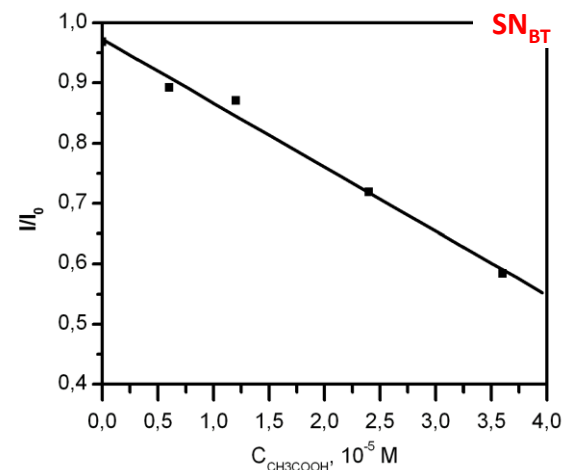
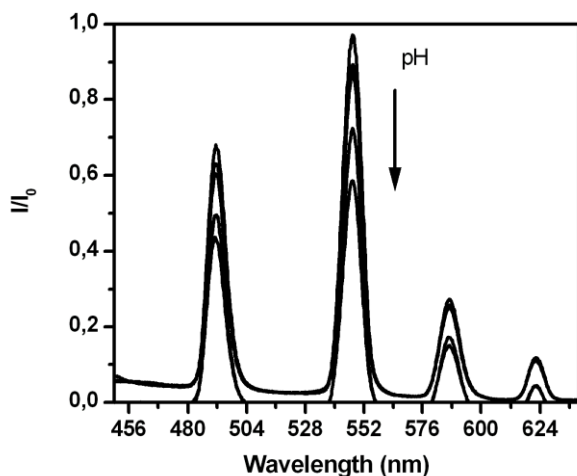
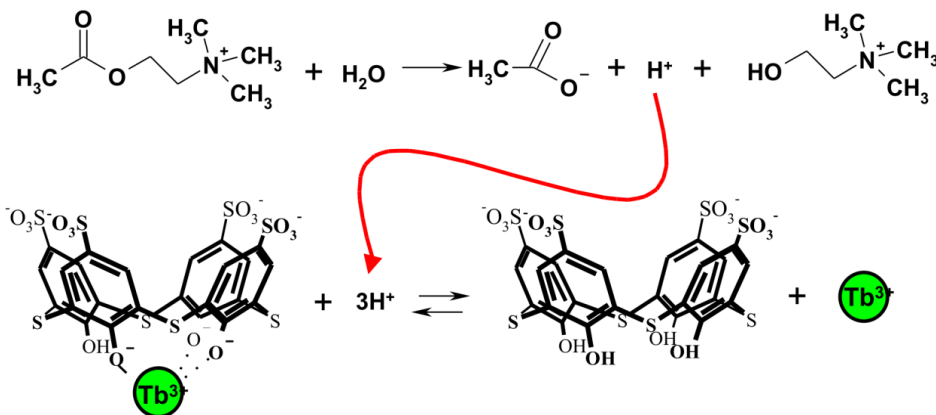


Рис. 12. Зависимость (а) интенсивности Tb(III)-люминесценции силикатных наночастиц, модифицированных бунгаротоксином (SN<sub>BT</sub>) и (б)  $I/I_0$  для SN<sub>BT</sub> при 545 нм от концентрации  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ( $C_{\text{NaCl}}=1 \text{ M}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}=330 \text{ нм}$ ), где  $I_0$  и  $I$  - интенсивности Tb(III)-люминесценции SN<sub>BT</sub> в отсутствие и присутствии  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .

## НАШИ ПЛАНЫ

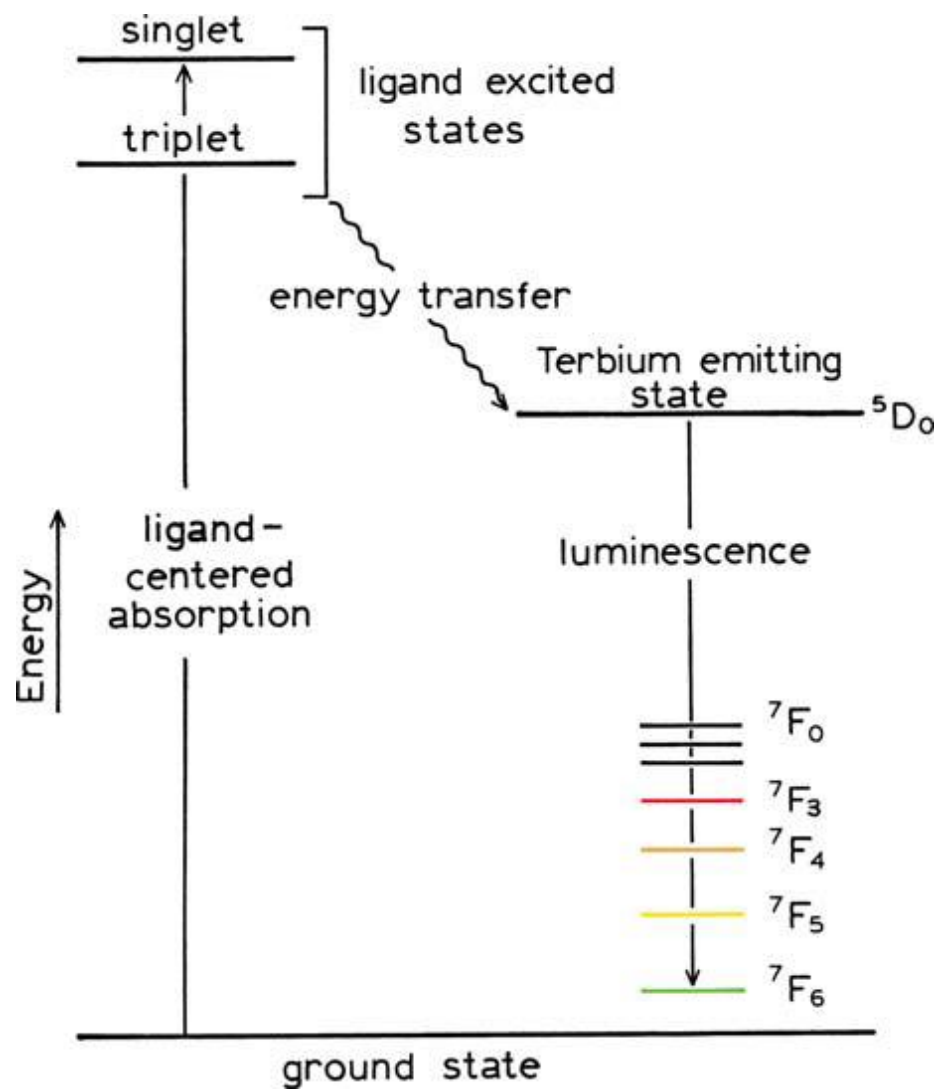
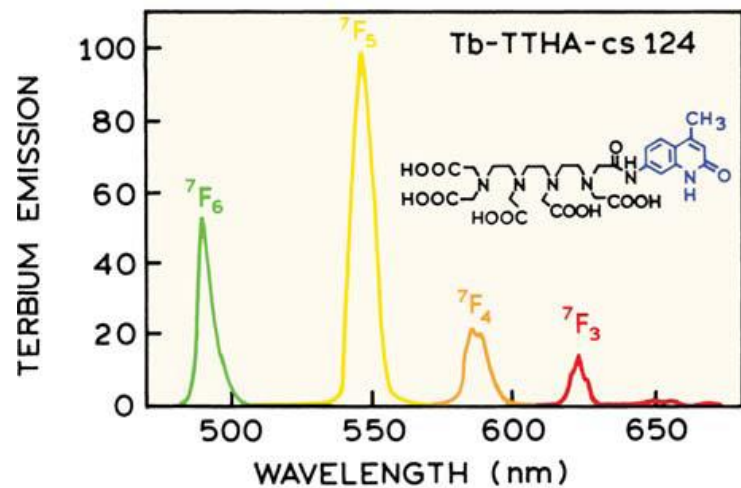
- 1) Определение количества связанного  $\alpha$ -бунгаротоксина;
- 2) Варьирование концентрации  $\alpha$ -бунгаротоксина, необходимого и достаточного для закрепления в синаптической щели;
- 3) Определение вторичной структуры белка -  $\alpha$ -бунгаротоксина после связывания с наночастицей;
- 4) Эксперименты непосредственно в синаптической щели.

## Благодарности

Проф. **Антипину И.С.**, **Соловьевой С.Е.** за предоставленное соединение TCAS,

Проф. **Массону П.**, **Петрову К.А.**

**Шестопалову М.А.** (Институт неорганической химии им. А.В. Николаева, Новосибирск) и **Соловьевой А.О.** (Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии , Новосибирск) за биологические исследования



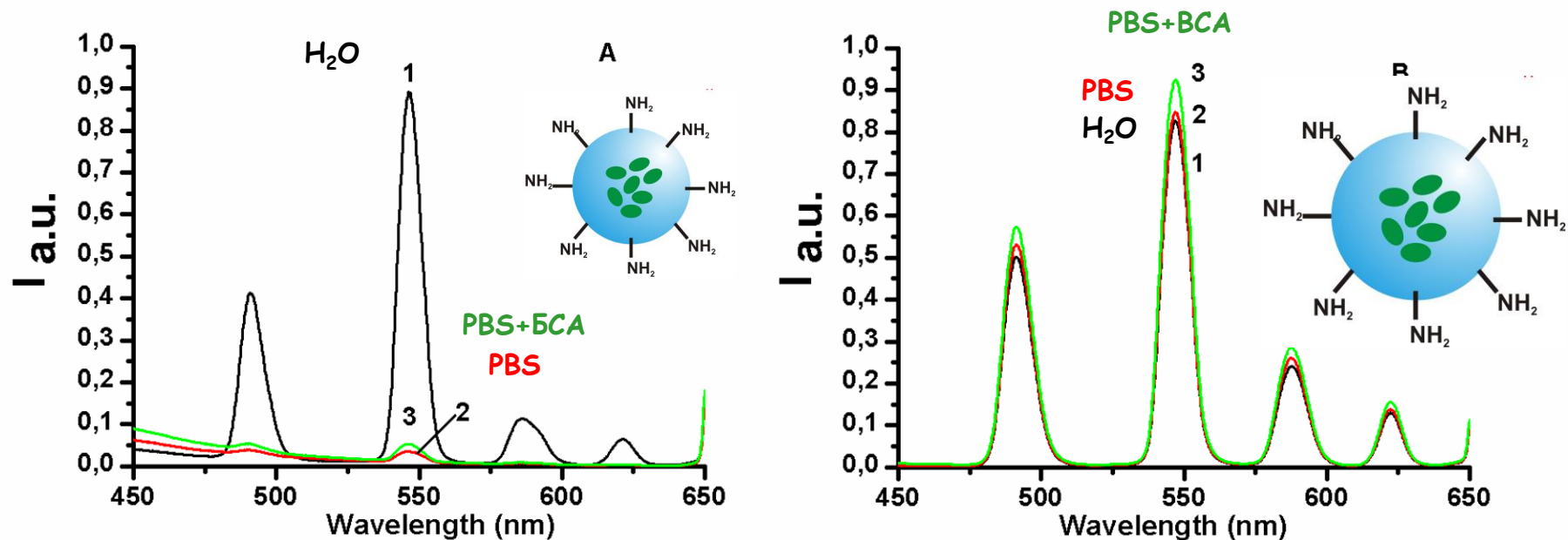
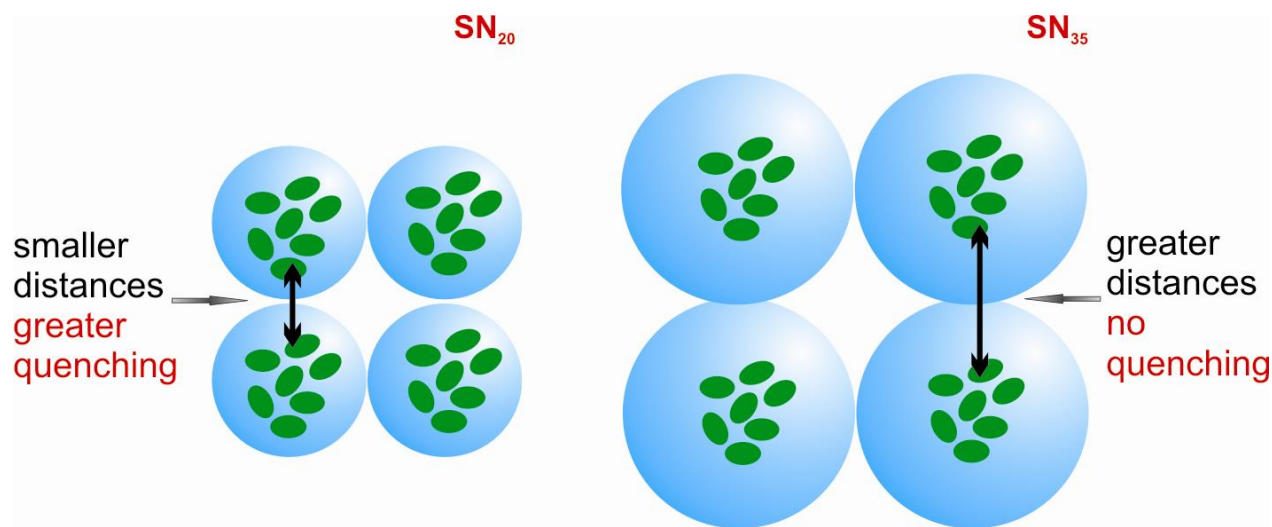
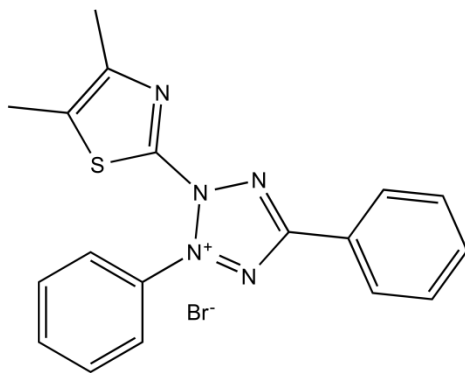


Рис. 6. Спектры эмиссии дисперсий  $SN_{20}$  (А) и  $SN_{35}$  (В) в воде (1), в PBS (2) и PBS-BCA растворе (3), где  $C_{SNs} = 0.05 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ ,  $C_{PBS} = 0.1 \text{ М}$ ,  $C_{BCA} = 1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  при  $pH = 7.4$ .



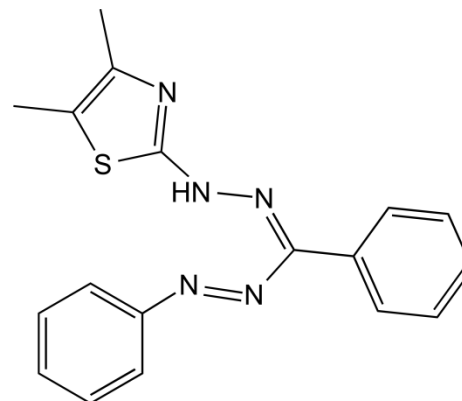
Схематичное изображение агрегационной модели для  $SN_{20}$  и  $SN_{35}$ .

# MTT test



3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
(MTT)

Mitochondrial Reductase



(E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan  
(Formazan)



Микротитрационный планшет после МТТ-теста.  
Увеличенное количество клеток видно по  
увеличению интенсивности пурпурного  
окрашивания.

# МЕХАНИЗМЫ ЭНДОЦИТОЗА

