

Учреждение образования  
«Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники»

УДК 616-076+57.089

Осипович  
Виталий Семёнович

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОБИОМАРКЕРНЫХ  
КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ КРИСТАЛЛОВ CdSe/ZnS ДЛЯ  
ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК И АНТИГЕНОВ В БИМЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук

по специальности 05.11.17 – Приборы, системы и изделия медицинского назначения

Минск 2010

Работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники»

Научный руководитель: **Яшин Константин Дмитриевич**, кандидат технических наук, доцент, заведующий кафедрой инженерной психологии и эргономики учреждения образования «Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники»

Официальные оппоненты: **Воробьева Татьяна Николаевна**, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры неорганической химии Белорусского государственного университета  
**Врублевский Игорь Альфонсович**, кандидат технических наук, докторант кафедры защиты информации учреждения образования «Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники»

Оппонирующая организация: Государственное научное учреждение «Институт физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси»

Защита состоится 16 декабря 2010 г. в 14<sup>00</sup> на заседании совета по защите диссертаций Д 02.15.06 при учреждении образования «Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники» по адресу: 220013, г. Минск, ул. П.Бровки, 6, корп. 1, ауд. 232, тел. 293-89-89, e-mail: dissovet@bsuir.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники».

Автореферат разослан 15 ноября 2010 г.

## КРАТКОЕ ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых материалов, методов и устройств для биомедицинских и диагностических применений является одним из приоритетных направлений развития современной науки и техники. Актуальным направлением является использование полупроводниковых нанокристаллов соединений  $A^IVB^VI$  в качестве основы формирования наноструктур для различных применений, в том числе и в качестве флуоресцентных маркеров в биологии и медицине. Интерес к полупроводниковым флуоресцентным нанокристаллам как биомаркерам для медицинских диагностических технологий (иммунолюминесцентного, иммуноферментного и цитофлуорометрического анализов) обуславливает необходимость детального изучения закономерностей формирования и оптических свойств биосовместимых наноструктур на их основе. Помимо важной фундаментальной составляющей эти данные необходимы для разработки конструкций и технологии синтеза нанобиомаркеров для различных биологических и медицинских применений. Биосовместимые наночастицы (нанобиомаркеры) могут быть использованы для идентификации клеток, а в дальнейшем, – для фотодинамической терапии и других методов лечения.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Связь работы с крупными научными программами, темами

Диссертационная работа выполнена на базе учреждения образования «Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники» (кафедра микро- и нанoeлектроники).

В работу включены результаты, полученные при выполнении исследований, проводимых в рамках Государственной программы ориентированных фундаментальных исследований «Электроника» и гранта Министерства образования Республики Беларусь:

- «Разработка физико-химических и технологических основ получения люминесцентных наночастиц из полупроводников», ГПОФИ «Электроника», № г.р. 22000865, 2005 г.;
- «Разработка физико-технологических основ создания электронного устройства экспресс-индикации возбудителей заболеваний», грант Министерства образования Республики Беларусь, № г.р. 22007934, 2007 г.

Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных исследований Республики Беларусь в

области междисциплинарных исследований, а именно нанотехнологий для медицинских и биологических приложений.

### **Цель и задачи исследования**

Целью диссертационной работы является разработка конструкций, технологий формирования и исследование свойств биосовместимых наноструктур на основе полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов селенида кадмия со слоем из сернистого цинка и создание нанобиомаркерных комплексов для биомедицинской диагностики.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи.

1. Провести анализ известных закономерностей и процессов получения нанокристаллов, их связывания с белковыми молекулами, а также способов применения нанокристаллов в медицине.

2. Разработать методику изучения фотостабильности нанобиомаркерных комплексов.

3. Исследовать закономерности формирования и изучить оптические свойства нанобиомаркерных комплексов (биосовместимых наноструктур).

4. Разработать конструкции, технологии синтеза, изготовить и опробовать экспериментальные образцы нанобиомаркерных комплексов для визуализации стволовых клеток, а также для иммунолюминесцентного анализа вируса герпеса тип 1 и визуализации нейронов.

Объект исследования – наноструктуры на основе нанокристаллов селенида кадмия CdSe с эпитаксиальным слоем сернистого цинка ZnS (CdSe/ZnS).

Предмет исследования – оптические свойства нанокристаллов CdSe/ZnS, закономерности формирования и эксплуатационные характеристики нанобиомаркерных комплексов для визуализации клеток и антигенов в биомедицинской диагностике.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Условия формирования неразрушающихся в водных растворах полупроводниковых нанокристаллов CdSe/ZnS, основанные на нанесении оболочки из меркаптоундекановой кислоты, или меркаптоуксусной кислоты, или цистеина, или триполиэтиленгликоля, или глутатиона, что позволило обеспечить флуоресценцию с постоянной интенсивностью до 45 минут с пиком на длине волны 560 – 570 нм при возбуждении световым излучением от 310 до 550 нм (световой поток 0,03 – 0,04 Вт/см<sup>2</sup>) и предложить использовать полученные структуры в изделиях, средствах и измерениях медицинского диагностического (иммунолюминесцентного, иммуноферментного, цитофлуориметрического) назначения.

2. Обработка гидрофильных наноструктур CdSe/ZnS/меркаптоундекановая кислота в смеси 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорида и N-гидроксисульфосукцинимид (в соотношении 1:8) в буфере морфолиноэтансульфоновой кислоты (рН 4,5) приводит к активации карбоксильных групп и обеспечивает связывание наноструктур с белковыми молекулами биотинилированного бычьего сывороточного альбумина или моноклональными антителами с образованием биосовместимых наночастиц (нанобиомаркерных комплексов) с размерами 10–15 нм, постоянной интенсивностью флуоресценции в течение 45 минут с пиком на длине волны 560–570 нм при возбуждении световым излучением от 310 до 550 нм (световой поток 0,03–0,04 Вт/см<sup>2</sup>) и квантовым выходом 60 %, что позволяет использовать эти комплексы при обработке медико-биологической информации и контроле биологических режимов развития живых организмов.

3. Конструкция нанобиомаркерных комплексов для идентификации трансплантированных стволовых клеток на основе флуоресцентно активных полупроводниковых нанокристаллов CdSe/ZnS содержит дополнительно нанесённую пассивирующую плёнку из плотноупакованных молекул меркаптоундекановой кислоты и биотинилированного бычьего сывороточного альбумина, что обеспечивает совместимость со стволовыми клетками, константу связи со стрептавидином  $10^{15}$ , увеличение в три раза времени наблюдения биологических объектов в люминесцентном микроскопе (по сравнению с использованием химических флюорохромов) и доведение его до 45 минут (при возбуждении световым потоком 0,03–0,04 Вт/см<sup>2</sup>) и позволяет изучать процессы лечебных воздействий при травмах головного мозга и, соответственно, управлять этими процессами.

4. Конструкция нанобиомаркерных комплексов для визуализации антигенов вируса простого герпеса тип 1 на основе флуоресцентно активного материала из полупроводниковых нанокристаллов CdSe/ZnS и дополнительно нанесённой пассивирующей плёнкой из плотноупакованных молекул меркаптоундекановой кислоты и моноклональных антител обеспечивает специфичность к антигенам, увеличивает в три раза время наблюдения антигенов (по сравнению с использованием химических флюорохромов) и доводит его до 45 минут (при возбуждении световым потоком 0,03–0,04 Вт/см<sup>2</sup>), что позволяет использовать разработанные изделия в иммунолюминесцентном анализе этого вируса.

#### **Личный вклад соискателя**

Содержание диссертации отражает личный вклад автора. Он заключается в научном обосновании возможности использования

нанобиомаркерных комплексов на основе полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов CdSe/ZnS со стабилизирующей тиольной оболочкой в биомедицинской диагностике, подготовке и проведении всех экспериментов по исследованию структуры и свойств разработанных нанобиомаркерных комплексов.

Определение целей и задач исследований, интерпретация и обобщение полученных результатов проводились с научным руководителем кандидатом технических наук К.Д. Яшиным, а также доктором медицинских наук В.А. Кульчицким, доктором медицинских наук Н.Н. Полещуком, доктором химических наук М.В. Артемьевым, кандидатом биологических наук З.Б. Квачевой, кандидатом биологических наук Л.В. Рубаник, кандидатом биологических наук Т.И. Терпинской, кандидатом технических наук В.П. Бондаренко, кандидатом химических наук Г.К. Жавнерко, кандидатом химических наук В.Д. Матвеевцевым, и аспирантом Белорусского государственного медицинского университета И.В. Пыко.

#### **Апробация результатов диссертации**

Основные положения диссертации обсуждались на международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, БГУ, 2008 г.), международной научной конференции «Наноструктурные материалы – 2008» (Минск, ИФП, 2008 г.), международных конференциях «Медэлектроника» (Минск, БГУИР, 2004, 2008 гг.), белорусско-российских научно-технических конференциях «Технические средства защиты информации» (Нарочь, Беларусь, 2006, 2007 гг.), международной научно-технической конференции «Современные средства связи» (Нарочь, Беларусь, 2006 г.), международной научно-практической конференции «Современная радиоэлектроника: научные исследования и подготовка кадров» (Минск, МГВРК, 2008 г.).

Результаты исследований внедрены в научно-экспериментальные работы по вирусологии Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» (акт внедрения от 15.10.2009 г.), в научно-исследовательские работы Института химии новых материалов НАН Беларуси (акт внедрения от 20.02.2009 г.), а также в учебный процесс БГУИР в качестве лекционного материала по дисциплине «Квантовые информационные системы» (акт внедрения от 12.12.2008 г.) и дисциплине «Охрана труда и основы экологии» (акт внедрения от 17.03.2007 г.).

## **Опубликованность результатов диссертации**

Материалы по теме диссертации опубликованы в 10 научных работах (5,2 авторских листа), соответствующих п. 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, включая:

- 9 статей в научных журналах в соавторстве. Автору принадлежит 4,9 авторских листа;

- 1 статью в сборнике научных трудов в соавторстве. Автору принадлежит 0,3 авторского листа.

Опубликовано 12 статей в материалах конференций, а также депонировано 2 рукописи.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, общей характеристики работы, четырёх глав с краткими выводами по каждой главе, заключения, списка использованных источников и приложений. В первой главе проведен анализ способов получения флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов CdSe/ZnS и различных конструкций флуоресцентных наноструктур, их свойств, рассмотрены основные области применения флуоресцентных наночастиц. Во второй главе представлено обоснование выбора полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов CdSe/ZnS в качестве основы для маркеров биомедицинского назначения и приводятся методики проведения экспериментов. Третья глава содержит результаты исследований структурных и оптических свойств выбранных материалов, а также результаты изучения влияния стабилизирующих тиолов и биологических покрытий на оптические свойства полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов. Исследуются закономерности формирования нанобиомаркерных комплексов. Полученные результаты использованы в четвертой главе для разработки и апробации конструкций, технологий синтеза и применения нанобиомаркерных комплексов для визуализации стволовых клеток, антигенов вируса герпеса тип 1 и нейронов. Приложение содержит копии актов внедрения. Общий объем диссертационной работы составляет 118 страниц. Работа включает 80 страниц текста, 57 иллюстраций на 42 страницах, 4 таблицы на 3 страницах, список использованных источников из 97 наименований на 8 страницах, 24 собственные публикации автора на 3 страницах и приложение на 6 страницах.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Во введении** изложена актуальность работы, основные достижения в области проводимых исследований и отражено место диссертации среди других исследований.

**В первой главе** проведен анализ научно-технической и патентной литературы по вопросам получения и применения различных флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов, в том числе и для биомедицинских применений. Наиболее перспективными для синтеза нанокристаллов являются методы коллоидной химии. При использовании этих методов получают нанокристаллы сферической формы размером от 2 до 6 нм в органических растворителях, полимеризующихся при комнатной или более низкой температуре. Отличительными особенностями метода являются относительно низкая температура (около 200 °С) синтеза коллоидных частиц, возможность широкого изменения концентрации частиц, небольшая концентрация поверхностных дефектов.

Нанокристаллы обладают гидрофобными свойствами и не могут быть использованы в водных средах. Одним из способов получения гидрофильных наноструктур (стабилизированных в водной среде нанокристаллов) является формирование стабилизирующей оболочки из тиольных покрытий. Стабилизирующее функционально-защитное покрытие должно обеспечивать: 1) высокий квантовый выход; 2) устойчивость в водных растворах; 3) устойчивость в среде с высокой ионной силой; 4) устойчивость к агрессивной среде, свету, кислороду; 5) связывание с лигандами, молекулами и соединениями различного типа.

**Во второй главе** приводится обоснование выбора полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов CdSe/ZnS в качестве основы нанобиомаркерных комплексов для визуализации клеток и антигенов в биомедицинской диагностике, рассматриваются методики исследования структурных и оптических свойств выбранных материалов и методики синтеза нанобиомаркерных комплексов.

Основной критерий, на котором основывался выбор исходного флуоресцентного материала для применения в медицинских диагностических технологиях, – это добиться максимальной схожести конечного продукта (нанобиомаркерных комплексов) по эксплуатационным характеристикам с современными химическими красителями (флюорохромами) для сохранения возможности использования стандартизованных Министерством здравоохранения Республики Беларусь методик проведения анализов, использующих химические флюорохромы.



Разработаны методики формирования нанобиомаркерных комплексов для визуализации стволовых клеток и антигенов вируса герпеса тип 1 путем химического связывания гидрофильных наноструктур CdSe/ZnS/меркаптоундекановая кислота (МУК) с молекулами биотинилированного бычьего сывороточного альбумина (БСА) и моноклональными антителами к антигену вируса герпеса (МАГ).

Разработана методика регистрации биотинилированного бычьего сывороточного альбумина на поверхности полученных комплексов, использующая высокую способность биотина связываться со стрептавидином (константа связывания  $\sim 10^{15}$ ). Применение микроконтактной печати и атомно-силового микроскопа позволяет получать изображения комплексов CdSe/ZnS/МУК/БСА на микрополосках стрептавидина.

Третья глава содержит результаты исследований структурных и оптических свойств исходных полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов, а также результаты изучения влияния покрытий из стабилизирующих тиолов и белковых оболочек (БСА и моноклональных антител к антигену вируса герпеса типа 1) на оптические свойства полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов. Исследования флуоресцентных свойств нанокристаллов CdSe/ZnS показали, что нанесение эпитаксиальной плёнки из сернистого цинка ZnS на нанокристаллы селенида кадмия CdSe приводит к увеличению интенсивности флуоресценции нанокристаллов в 3 – 3,5 раза без смещения пика флуоресценции (рисунки 1, 2).

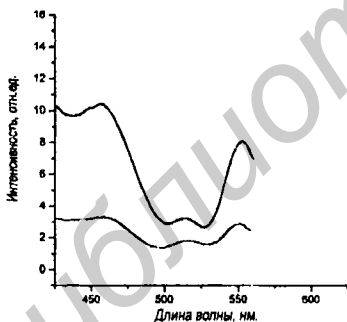


Рисунок 1 – Спектры поглощения нанокристаллов CdSe (нижний) и CdSe/ZnS (верхний)

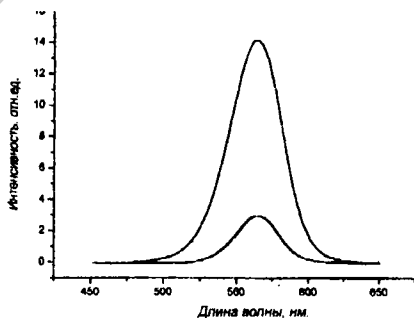
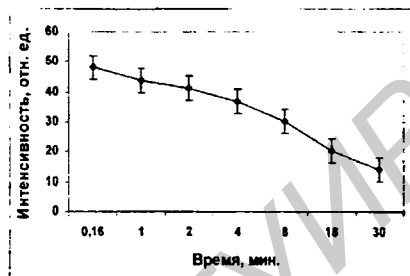
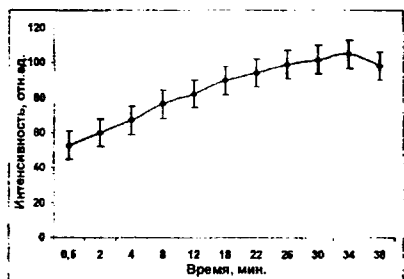


Рисунок 2 – Спектры флуоресценции нанокристаллов CdSe (нижний) и CdSe/ZnS (верхний)

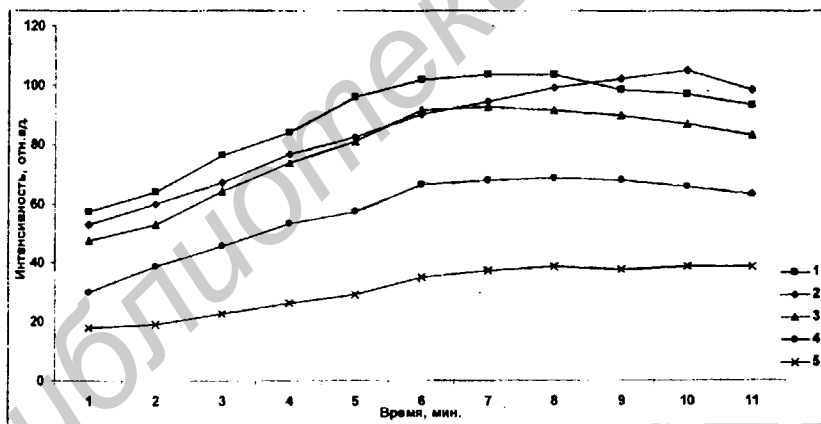
В ходе исследований были получены зависимости интенсивности флуоресценции от времени возбуждения световым излучением и лазерным излучением гидрофильных наноструктур CdSe/ZnS и химического флюорохрома Хехст-33342. Наблюдался равномерный рост интенсивности

флуоресценции нанокристаллов с первой по 34 минуту возбуждения (рисунок 3). Сравнительные исследования интенсивности флуоресценции флюорохрома Хехст-33342 установили её уменьшение в зависимости от времени облучения (рисунок 4).



**Рисунок 3 – Зависимость интенсивности флуоресценции от времени возбуждения световым излучением нанокристаллов CdSe/ZnS**

**Рисунок 4 – Зависимость интенсивности флуоресценции от времени возбуждения световым излучением флюорохрома Хехст-33342**



**1 – оболочка из меркаптоуксусной кислоты; 2 – оболочка из тиополиэтиленгликоля; 3 – оболочка из меркаптоундекановой кислоты; 4 – оболочка из цистеина; 5 – оболочка из глутатиона**

**Рисунок 5 – Зависимость интенсивности флуоресценции от времени засвечивания световым излучением нанокристаллов CdSe/ZnS с функционально-защитными оболочками**

Кроме того, были получены зависимости интенсивности флуоресценции от времени возбуждения световым излучением гидрофильных наноструктур с

различными функционально-защитными стабилизирующими оболочками. Анализ зависимостей интенсивности флуоресценции от времени возбуждения для нанокристаллов CdSe/ZnS с тиольными покрытиями из триполиэтиленгликоля, меркаптоундекановой кислоты, меркаптоуксусной кислоты, цистеина и глутатиона (рисунок 5) показывает, что тип функционально-защитной стабилизирующей оболочки не оказывает влияния на фотостабильность полупроводниковых нанокристаллов. Кроме того, как показывают эксперименты, после агрегации (т.е. после образования конгломератов) наночастиц в функционально-защитной полимерной оболочке зависимость интенсивности флуоресценции от времени возбуждения сохраняется.

Исследование фотостабильности нанобиомаркерных комплексов для визуализации стволовых клеток (гидрофильных наноструктур, связанных с биотинилированным бычьим сывороточным альбумином) и для визуализации антигенов вируса герпеса (гидрофильных наноструктур, связанных с моноклональными антителами к вирусу герпеса) показало, что белковое покрытие практически не оказывает влияния на характер интенсивности флуоресценции комплексов (рисунок 6).

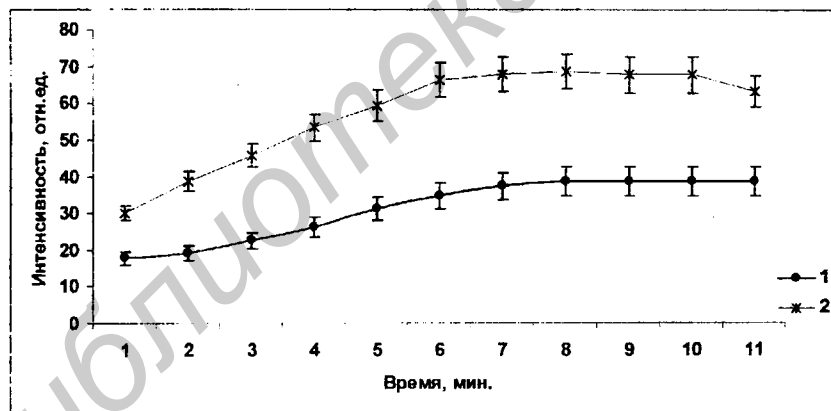


Рисунок 6 – Зависимость интенсивности флуоресценции от времени засвечивания световым излучением наноструктур CdSe/ZnS/MYK/бСА (1) и CdSe/ZnS/MYK/МАГ (2)

В четвертой главе представлены результаты разработки конструкций и технологий синтеза нанобиомаркерных комплексов для визуализации стволовых клеток, антигенов вируса герпеса, нейронов и результаты испытаний синтезированных комплексов различных конструкций и различного

применения. Проанализированы результаты исследования цитотоксичности нанобиомаркерных комплексов различных конструкций, приведены рекомендации по практическому их использованию. Кроме того, разработана технология синтеза нанобиомаркерных комплексов и технология применения их для визуализации клеток и антигенов.

При разработке нанобиомаркерных комплексов была исследована цитотоксичность наноструктур различных конструкций при их взаимодействии со стволовыми клетками (рисунки 7, 8). В итоге, конструкция нанобиомаркерных комплексов для мечения стволовых клеток включает в себя следующие элементы: 1) полупроводниковое ядро селенида кадмия CdSe; 2) полупроводниковый эпитаксиальный слой сернистого цинка ZnS; 3) тиольную стабилизирующую оболочку из меркаптоундекановой кислоты  $\text{SHC}_{10}\text{H}_{20}\text{COOH}$ ; 4) белковую оболочку биотинилированного бычьего сывороточного альбумина. Разработанные нанобиомаркерные комплексы использовались для идентификации стволовых клеток, трансплантированных лабораторным животным (мышам). Нанобиомаркерные комплексы сохранили способность к флуоресценции после двухнедельного пребывания в организме животного и в течение месяца после препарирования головного мозга исследуемых животных.



**Рисунок 7 – Люминесцентная фотография культур стволовых клеток после добавления наноструктур CdSe/ZnS/МУК**



**Рисунок 8 – Люминесцентная фотография культур стволовых клеток после добавления наноструктур CdSe/ZnS/МУК/БСА**

Конструкция нанобиомаркерных комплексов для визуализации антигенов вируса герпеса тип 1 включает в себя все элементы предыдущей конструкции с тем отличием, что в качестве белковой оболочки использованы моноклональные антитела к антигенам вируса герпеса тип 1. Разработанные нанобиомаркерные комплексы использовались для идентификации антигенов

вируса герпеса в культурах клеток в сравнении с коммерческим набором (рисунки 9, 10). В поле зрения наблюдается 30 клеток (рисунок 9). В цитоплазме и околядерной цитоплазме клеток наблюдается яркое свечение глыбок. Это свидетельствует о том, что специфические антитела, связанные с нанокристаллами, закрепились на антигенах герпеса внутри клеток.



**Рисунок 9 – Люминесцентная фотография – результаты анализа герпеса тип 1 с применением разработанных нанобиомаркеров**



**Рисунок 10 – Люминесцентные фотографии – результаты анализа герпеса тип 1 с применением коммерческого набора**

Конструкция нанобиомаркерных комплексов для визуализации нейронов включает флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы CdSe/ZnS, стабилизированные в воде с использованием смеси тиолов, состоящей на 70 – 80 % из меркаптопропионовой кислоты и на 20 – 30 % из тиоглицерина. Проведено исследование по визуализации нейронов разработанными комплексами. На рисунке 11 изображена фотография области гранулярного слоя среза гиппокампа крысы в процессе инкубирования. Из фотографии можно видеть, что нанобиомаркерные комплексы избирательно воспринимаются клетками гранулярного слоя. После промывки срезов можно видеть, что гидрофильные наноструктуры остались в некоторых клетках

(рисунок 12). Это свидетельствует о проникновении гидрофильных наноструктур внутрь некоторых типов клеток.

Таким образом, гидрофильные наноструктуры со стабилизирующим покрытием, состоящим из смеси меркаптопропионовой кислоты и тиоглицерина, могут быть использованы для визуализации отдельных типов нейронов. Дальнейшим развитием методики может быть модификация молекулярного стабилизирующего покрытия нанокристаллов с целью формирования селективных свойств по отношению к определенным участкам клеточной мембраны или к определенным клеточным рецепторам. Это позволит, например, получать графическое изображения распределения рецепторов (картирование рецепторов) фармакологических препаратов.

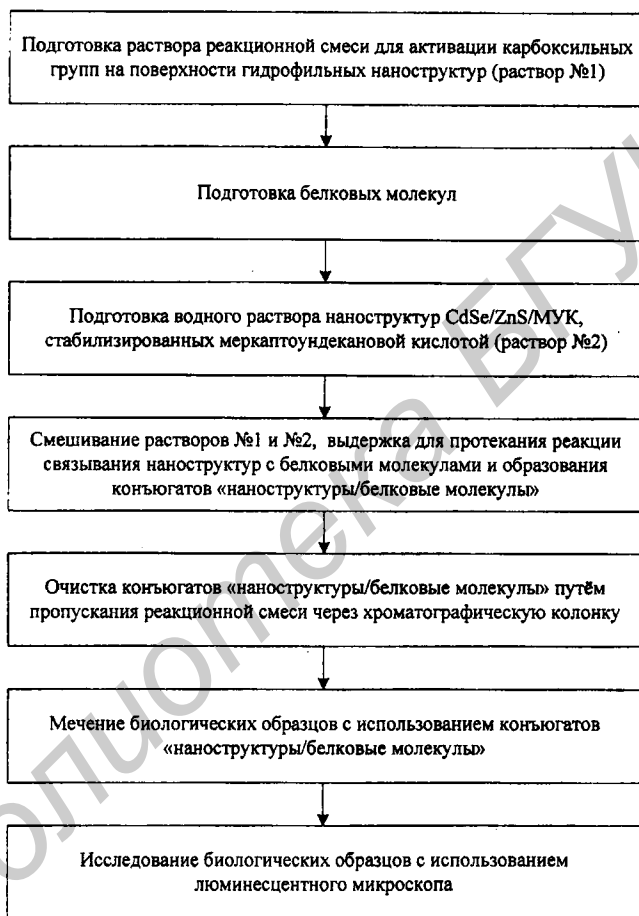


**Рисунок 11 – Фотография – область гранулярного слоя гиппокампа после инкубации в растворе, содержащем нанобиомаркерные комплексы**



**Рисунок 12 – Фотография – клетки гранулярного слоя после промывки среза**

На основании экспериментальных исследований разработанных конструкций можно сделать вывод, что процесс формирования нанобиомаркерных комплексов с использованием полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов CdSe/ZnS включает следующие этапы, отражённые на рисунке 13.



**Рисунок 13 – Технологический маршрут получения комплексов, связанных с белковыми молекулами**

В приложениях представлены акты об использовании и внедрении результатов диссертационной работы в научно-экспериментальные работы по вирусологии Государственного учреждения «Республиканский научно-

практический центр эпидемиологии и микробиологии», в научно-исследовательские работы Института химии новых материалов НАН Беларуси и в учебный процесс учреждения образования «Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Разработана методика формирования биосовместимых с клетками и клеточными компонентами нанокристаллов CdSe/ZnS. Показана необходимость обработки гидрофильных наноструктур CdSe/ZnS/меркаптоундекановая кислота в смеси двух веществ: 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимид гидрохлорид и N-гидроксисульфосукцинимид. Установлено, что оптимальным отношением этих веществ является 1:8 (в буфере морфолиноэтансульфоновой кислоты, pH 4,5). Обработка приводит к активации карбоксильных групп МУК, а последующее добавление белковых молекул, – к образованию нанобиомаркерных комплексов. Флуоресцентные характеристики синтезированных комплексов позволяют использовать их при изучении биотехнических систем [7-А, 8-А], а также контролировать биологические режимы развития живых организмов [9-А, 10-А].

2. Разработаны конструкция и технология синтеза нанобиомаркерных комплексов для визуализации стволовых клеток. Показано, что разработанные комплексы пригодны для идентификации клеток, трансплантированных лабораторным животным, и установлено, что синтезированные комплексы обладают квантовым выходом 55 – 60 %, константой связи со стрептавидином  $10^{-15}$  [2-А, 7-А, 9-А].

3. Разработаны конструкция и технология синтеза нанобиомаркерных комплексов для визуализации антигенов вируса герпеса тип 1, которые обладают квантовым выходом 55 – 60 % и специфичностью к антигенам вируса. Установлено оптимальное отношение моноклональных антител и биотинилированного бычьего сывороточного альбумина, равное 3:7 [4-А, 5-А, 8-А].

4. Установлено, что разработанные нанобиомаркерные комплексы на основе полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов CdSe/ZnS пригодны для использования в медицинских диагностических технологиях. Иммунолюминесцентный анализ, выполненный в соответствии со стандартизированной и принятой в Министерстве здравоохранения Республики Беларусь методикой, показал возможность их использования для идентификации антигенов вирусных инфекций [3-А, 7-А, 10-А].



## Рекомендации по практическому использованию результатов диссертации

1. Разработанные нанобиомаркерные комплексы [7-А, 9-А, 23-А] целесообразно использовать: для получения лекарственных препаратов на стволовых клетках для лечения травм мозга человека; для разработки и производства диагностических тест-систем обнаружения различных вирусов; для визуализации сосудистой сети при проведении хирургических операций; для диагностики опухолевых заболеваний путём визуализации сосудистой сети опухолей, метастазов и сигнальных лимфоузлов; для картирования рецепторов фармакологических препаратов.

2. Разработанную конструкцию нанобиомаркерных комплексов целесообразно использовать при локализации стволовых клеток в организме. Показана возможность повышения эксплуатационных характеристик биомаркерных комплексов для идентификации трансплантированных клеток. Установлено, что продолжительность наблюдений в люминесцентном микроскопе промаркированных клеток и антигенов составляет 30 – 40 минут (световой поток  $0,03 - 0,04 \text{ Вт/см}^2$ ) при низкой цитотоксичности и эффективной флуоресценции (квантовый выход 55 – 60 %). Срок пребывания в организме животного превысил две недели [8-А, 10-А].

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в научных журналах*

1-А. Квантовые микросистемы / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.А. Золотой, А.В. Павлов // Нано- и микросистемная техника, – 2007. – №2. – С. 62 – 67.

2-А. Осипович, В.С. Люминесцентные полупроводниковые наночастицы / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.Е. Пицук // Нано- и микросистемная техника. – 2007. – №2. – С. 70 – 74.

3-А. Осипович, В.С. Получение наночастиц / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.Е. Пицук // Нано- и микросистемная техника. – 2007. – №5. – С. 2 – 7.

4-А. Осипович, В.С. Структура нанокристаллов селенида кадмия, полученных методами коллоидной химии для применения в медицинской диагностике / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.Е. Пицук // Доклады БГУИР. – 2007. – №3 (19). – С. 74 – 79.

5-А. Осипович, В.С. Исследование фотолюминесцентных свойств нанокристаллов селенида кадмия CdSe, предназначенных для использования в

клинической диагностике / В.С. Осипович, К.Д. Яшин // Доклады БГУИР. – 2008. – №2 (32). – С. 72 – 77.

6-А. Исследование композитного материала на основе пористого кремния и наночастиц CdSe/ZnS / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, Е.Б. Чубенко, В.П. Бондаренко // Доклады БГУИР. – 2008. – №3 (33). – С. 66 – 70.

7-А. Нанобиополупроводниковая система визуализации клеток / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, Т.И. Терпинская, Р.Г. Лемеш, В.А. Кульчицкий // Нано- и микросистемная техника. – 2008. – №12 (101). – С. 48 – 53.

8-А. Нанотехнологии для медицинской диагностики: привитальная визуализация клеток с использованием нанокристаллов / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, В.М. Логин, Т.И. Терпинская // Рецепт. – 2009. – №3 (65). – С. 142 – 146.

9-А. Осипович, В.С. Конструкция полупроводниковых наночастиц, совместимых со стволовыми клетками / В.С. Осипович, К.Д. Яшин // Доклады БГУИР. – 2010. – №1 (47). – С. 77 – 83.

#### *Статьи в сборниках научных трудов*

10-А. Осипович, В.С. Технология визуализации клеток для экологической токсикологии / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, Т.И. Терпинская, Р.Г. Лемеш, В.А. Кульчицкий // Здоровье и окружающая среда: сборник научных трудов / БелСАинформ, Смэлток: редкол. И.А. Застенская [и др.]. – 2009. – Вып. 13. – С. 521 – 526.

#### *Статьи в материалах конференций*

11-А. Осипович, В.С. Разработка физико-химических и технологических основ получения люминесцентных наночастиц из полупроводников / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.Е. Пицук // Медэлектроника 2004: материалы международной научно-технической конференции, Минск, 4–6 декабря 2004 г. / БГУИР; редкол.: М.П. Батура [и др.], – Минск, 2004. – С 153 – 158.

12-А. Осипович, В.С. Технические средства визуализации информации / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.Е. Пицук // Технические средства защиты информации»: материалы III Белорусско-российской научно-технической конференции, Минск-Нарочь, 23 – 27 мая 2005 г. / Доклады БГУИР; редкол.: В.Ф. Голиков [и др.]. – Минск, – 2005, – №5, – С. 50.

13-А. Осипович, В.С. Энергия поглощения CdSe / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.Е. Пицук // Современные средства связи: материалы XIV международной научно-технической конференции Минск, 29 сентября – 2

октября 2005 г. / БГУИР, ВГКС; редкол.: М.А. Баркун [и др.]. – Минск, 2005. – №1 (19)/5, – С. 64 – 66.

14-А. Осипович, В.С. Водородная и квантово-механическая модели энергии поглощения / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.Е. Пицук // Технические средства защиты информации: материалы IV Белорусско-российской научно-технической конференции, Минск-Нарочь, 29 мая – 2 июня 2006 г. / Минобразования РБ, Гос. центр безопасности инф.; редкол.: В.Ф. Голиков [и др.]. – Минск, 2006. – С. 78.

15-А. Осипович, В.С. Люминесцентные  $A^2B^6$ -полупроводники / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.Е. Пицук // Современные средства связи: материалы XIV международной научно-технической конференции, Минск, 29 сентября – 2 октября 2005 г. / БГУИР, ВГКС; редкол.: М.А. Баркун [и др.]. – Минск, 2005. – №1 (19)/5, – С. 67 – 69.

16-А. Осипович, В.С. Полупроводниковые люминесцентные нанометки: современная задача системы подготовки инженерных кадров / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.Е. Пицук, Е.Д. Заровская // Управление инновационной деятельностью в образовании и производстве: материалы республиканской научно-методической конференции, Минск, 2 – 4 декабря 2005 г. / РИИТ БНТУ, редкол. Б.М. Хрусталёв [и др.]. – Минск, 2006. – С. 74.

17-А. Осипович, В.С. Оптические свойства нанокристаллов CdSe / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.Е. Пицук, Е.Д. Заровская // Технические средства защиты информации»: материалы IV Белорусско-российской научно-технической конференции, Минск-Нарочь, 29 мая – 2 июня 2006 г. / Минобразования РБ, Гос. центр безопасности инф.; редкол.: В.Ф. Голиков [и др.]. – Минск, 2006. – С. 79.

18-А. Осипович, В.С. Рентгеноструктурный микроанализ и электронная микроскопия нанокристаллов CdSe / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, С.Е. Пицук, Л.Д. Буйко, В.В. Цыбульский, В.П. Лесникова // Технические средства защиты информации»: материалы IV Белорусско-российской научно-технической конференции, Минск-Нарочь, 29 мая – 2 июня 2006 г. / Минобразования РБ, Гос. центр безопасности инф.; редкол.: В.Ф. Голиков [и др.]. – Минск, 2006. – С. 81.

19-А. Осипович, В.С. Фотостабильность нанокристаллов CdSe/ZnS / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, К.В. Лазнев // Технические средства защиты информации: материалы V Белорусско-российской научно-технической конференции, Минск-Нарочь, 22 – 25 мая 2007 г. / Минобразования РБ, Гос. центр безопасности инф.; редкол.: В.Ф. Голиков [и др.]. – Минск, 2007., – С. 87.

20-А. Осипович, В.С. Осаждение наночастиц CdSe/ZnS в матрицу пористого кремния / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, Е.Б. Чубенко, В.П. Бондаренко // Наноструктурные материалы – 2008: материалы первой международной научной

конференции, Минск, 22 – 25 апреля 2008 г. / Институт физики полупроводников НАН Беларуси: редкол. Ж.И. Алфёров [и др.]. – Минск, 2008. – С. 568.

21-А. Осипович, В.С. Перспективы использования полупроводниковых наночастиц для привитальной визуализации клеток / В.С. Осипович, К.Д. Яшин, Т.И. Терпинская, Р.Г. Лемеш, В.А. Кульчицкий // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: сборник статей международной научной конференции, Минск, 3 – 5 июня 2008 г. / Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси; редкол. И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2008. – С. 342 – 344.

22-А. Osipovich, V.S. Applications of semiconductor biomarkers for diagnostics of pancreatic diabetes / V.S. Osipovich, K.D. Yashin // Медэлектроника 2008: сборник научных статей, Минск, 11 – 12 декабря 2008 г. / БГУИР; редкол.: М.П. Батура [и др], – Минск, 2008. – С. 184 – 189.

### *Депонированные рукописи*

23-А. Яшин К. Д. Разработка физико-химических и технологических основ получения люминесцентных наночастиц из полупроводников: отчет о НИР № г.р. 2005756 / К.Д. Яшин, В.С. Осипович, С.Е. Пицук; Учреждение образования «Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники», – Минск, 2005, – 60 с. : Деп. в ГУ «БелИСА» 07.04.06 г.

24-А. Яшин, К. Д. Разработка физико-технологических основ электронного устройства экспресс-индикации возбудителей заболеваний: отчет о НИР № г.р. 2007934 / К. Д. Яшин, В. С. Осипович, Т. Г. Божко; Учреждение образования «Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники». – Минск, 2008. – 59 с. : Деп. в ГУ «БелИСА» 20.03.2008 г.

Асіповіч Віталій Сямёнавіч

**Сінтэз і ўласцівасці флуарэсцэнтных нанабіямаркерных комплексаў на  
выснове паўправадніковых крышталёў CdSe/ZnS для візуалізацыі клетак  
і антыгенаў у біямедыцынскай дыягностыцы**

*Ключавыя словы:* нанаструктуры, нанабіямаркерныя комплексы, фотастабільнасць, цітатаксічнасць, ствалавыя клеткі, антыгены.

*Мэта працы:* распрацоўка канструкцый, тэхналогій фарміравання і даследванне якасцей біясумяшчальных нанаструктур на выснове паўправадніковых флуарэсцэнтных нанакрышталёў селяніда кадмія са слоём з сярністага цынку і ствырэнне на нанабіямаркерных комплексаў для медыцынскіх дыягностычных тэхналогій.

*Метады даследавання і апаратура:* спектрафотаметрыя, рэнтгенаспектральны аналіз, атамна-сілавая і сканіруючая электронная мікраскапія, люмінесцэнтная і аптычная мікраскапія.

*Атрыманыя вынікі і іх навізна:* распрацаваны канструкцыі нанабіямаркерных комплексаў на выснове флуарэсцэнтных паўправадніковых нанокрышталёў CdSe/ZnS для ужывання ў біямедыцынскай дыягностыцы. Атрыманы нанабіямаркерныя комплексы для візуалізацыі стволавых клетак і вынаходжвання антыгенаў віруса герпеса ў культурах клетак. Паказана, што высокія аптычныя і эксплуатацыйныя ўласцівасці распрацаваных комплексаў (фотастабільнасць больш 3 часоў, вузкі спектр флуарэсцэнцыі, квантавы выхад 60 %), дазваляе павялічыць час правядзенне медыцынскіх даследванняў.

*Ступень выкарыстання:* вынікі даследавання скарыстаныя ў навукова-эксперыментальных распрацоўках па вірусалогіі Дзяржаўнай установы «Рэспубліканскі навукова-практычны цэнтр эпідэміялогіі і мікрабіялогіі», ў навукова-даследчых працах Інстытута хіміі новых матэрыялаў НАН Беларусі і ў навучальным працэсе установы адукацыі «Беларусскі дзяржаўны ўніверсітэт інфарматыкі і радыёэлектронікі».

*Галіна ужывання:* дыягностыка розных захворванняў чалавека праз вызначэнне антыгенаў з ужываннем нанабіямаркерных комплексаў; прывітальная візуалізацыя клетак з мэтай вывучэння шляхоў іх міграцыі; візуалізацыя сасудзістай сеткі пры правядзенні хірургічных аперацый і для дыягностыкі пухлінных захворванняў (візуалізацыя сасудзістай сеткі пухлін, метастазаў і сігнальных лімфавузлоў).

Осипович Виталий Семёнович

## Синтез и свойства флуоресцентных нанобиомаркерных комплексов на основе полупроводниковых кристаллов CdSe/ZnS для визуализации клеток и антигенов в биомедицинской диагностике

*Ключевые слова:* наноструктуры, нанобиомаркерные комплексы, фотостабильность, цитотоксичность, стволовые клетки, антигены.

*Цель работы:* разработка конструкций, технологий формирования и исследование свойств биосовместимых наноструктур на основе полупроводниковых флуоресцентных нанокристаллов селенида кадмия со слоем из сернистого цинка и создание нанобиомаркерных комплексов для биомедицинской диагностики.

*Методы исследования и оборудование:* спектрофотометрия, рентгеноспектральный анализ, атомно-силовая и сканирующая электронная микроскопия, люминесцентная и оптическая микроскопия.

*Полученные результаты и их новизна:* разработаны конструкции нанобиомаркерных комплексов на основе флуоресцентных полупроводниковых нанокристаллов CdSe/ZnS для применения в биомедицинской диагностике. Получены нанобиомаркерные комплексы для визуализации стволовых клеток и определения антигенов герпеса в культурах клеток. Показано, что высокие оптические и эксплуатационные свойства разработанных комплексов (фотостабильность более 3 часов, узкий спектр флуоресценции, квантовый выход 60 %) позволят увеличить время проведения медицинских исследований.

*Степень использования:* результаты исследований использованы в научно-экспериментальных работах по вирусологии Государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии», в научно-исследовательских работах Института химии новых материалов НАН Беларуси и в учебном процессе учреждения образования «Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники».

*Область применения:* диагностика различных заболеваний человека путём определения антигенов с использованием нанобиомаркерных комплексов; привитальная визуализация клеток с целью изучения путей их миграции; визуализация сосудистой сети при проведении хирургических операций и для диагностики опухолевых заболеваний (визуализация сосудистой сети опухолей, метастазов и сигнальных лимфоузлов).

## SUMMARY

**Osipovich Vitalij Semenovich**

### **Synthesis and properties of fluorescent nanobiomarker complexes on the basis of semiconductor crystals CdSe/ZnS for cells and antigen visualization in biomedical diagnostics**

*Keywords:* nanostructures, nanobiomarker complexes, photostability, cytotoxicity, stem cells, antigens.

*The research purpose:* development of constructions, formation technology and study biocompatible nanostructures based on semiconductor fluorescent nanocrystals cadmium selenide covered with layer of zinc sulphide and creation nanobiomarker complexes for biomedical diagnostic.

*Investigation methods and equipment:* spectrophotometry, X-ray spectrum analysis, atomic-force and scanning electronic microscopy.

*The received results and their novelty:* nanobiomarker complexes constructions are developed on the basis of fluorescent semiconductor nanocrystals for application in biomedical diagnostics. In order to visualize stem cells and to identify herpes antigens in cell culture, nanobiomarker complexes are obtained. It is shown that high optical and operational properties of developed complexes (photostability more than 3 hours, narrow spectrum of fluorescence, quantum efficiency 60 %) enable to increase time of carrying out medical investigations.

*Usage considerations:* the results of researches were used in scientific-experimental works on virology of Public institution «Republic scientific-practical center of epidemiology and microbiology», in research works of Institute of chemistry of new materials of NAS of Belarus and in the educational process of establishment of education «Belarusian state university of informatics and radio electronics».

*Application field:* diagnostics of various humans diseases by antigen identification with the use of nanobiomarker complexes; cells in vivo visualization for the purpose of study of it's migration ways; vascular network visualization when carrying out an surgical operation and for tumorous diseases diagnostics (vascular network tumors, metastasis and signaling lymph nodes visualization).

Научное издание

Осипович Виталий Семёнович

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ НАНОБИОМАРКЕРНЫХ  
КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ КРИСТАЛЛОВ  
CdSe/ZnS ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК И АНТИГЕНОВ  
В БИМЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук

по специальности 05.11.17 – Приборы, системы и изделия медицинского  
назначения

---

Подписано в печать 09.11.2010.	Формат 60x84 <sup>1</sup> / <sub>16</sub> .	Бумага офсетная.
Гарнитура «Таймс».	Отпечатано на ризографе.	Усл. печ. л. 1,63 .
Уч.-изд. л. 1,3.	Тираж 60 экз.	Заказ 788.

---

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования  
«Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники»  
ЛИ №02330/0494371 от 16.03.2009. ЛП №02330/0494175 от 03.04.2009.  
220013, Минск, П. Бровки, 6.