

14.1

Наноразмерный корреляционный анализ морфологической, оптической и магнитной структуры полимерных микросфер для мультиплексной диагностики

© К.Е. Мочалов¹, О.И. Агапова², А.Н. Генералова¹, И.С. Васкан^{1,3}, Д.О. Соловьева¹, В.А. Олейников¹, И.И. Агапов², А.Е. Ефимов^{2,4,¶}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова Минздрава России, Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская обл., Россия

⁴ ООО „СНОТРА“, Москва, Россия

¶ E-mail: antefimov@gmail.com

Поступило в Редакцию 7 ноября 2019 г.

В окончательной редакции 28 ноября 2019 г.

Принято к публикации 28 ноября 2019 г.

Представлена единая аналитическая технология, основанная на интеграции сканирующей зондовой нанотомографии и оптической микроскопии (СЗНТ–ОМ) и продемонстрирован потенциал технологии на примере многопараметрического анализа кодируемых микросфер. Представленная технология СЗНТ–ОМ может стать мощным инструментом для мультимодальной нанохарактеризации широкого спектра микрочастиц, композитных и гибридных полимеров.

Ключевые слова: мультиплексный анализ, наночастицы, корреляционная нанотомография, флуоресцентная спектроскопия, магнитно-силовая микроскопия.

DOI: 10.21883/PJTF.2020.05.49103.18103

За последние десятилетия дисперсии полимерных частиц, известные как латексы, получили широкое применение при решении задач в областях, где решающую роль играют объемные, коллоидные и поверхностные свойства дисперсного материала. В настоящее время дисперсии частиц преимущественно субмикронного размера начали активно использоваться в высокотехнологичных областях, в частности, для биомедицинских и биотехнологических исследований [1]. Технологии разработки латексов с инновационными свойствами основываются на получении дисперсий частиц, обладающих такими характеристиками, как большая площадь поверхности, гетерогенный полимерный состав, возможность получения частиц разных размеров (10 nm–1 μm) и форм с узкими распределениями по размерам, морфологии, функциональности, а также образования органико-неорганических (гибридных) частиц [2].

Все эти свойства должны тщательно контролироваться и характеризоваться с использованием соответствующих микроскопических методик.

В последнее время многофункциональные полимерные частицы, имеющие несколько функциональных составляющих, например флуоресцентную и магнитную, привлекают большое внимание [3], в первую очередь благодаря их применению в системах мультиплексного анализа, предназначенных для одновременного обнаружения нескольких биомаркеров в одном образце биологического материала (например, сыворотки). Ос-

новой мультиплексного анализа является комбинация проточной цитометрии с использованием флуоресцентно окрашенных микросфер, конъюгированных со специфическими антителами. Флуоресцентно меченные микросферы, применяемые в многопараметрических системах иммунного анализа, кодируются уникальной спектрально отличимой комбинацией красителей и содержат встроенные магнитные наночастицы (МНЧ), что позволяет сформировать в проточной ячейке подобие микрочипов для последующего флуоресцентного анализа присутствия патогена на их поверхности. Таким образом, каждая такая микросфера представляет собой нанотехнологическую „лабораторию“ для обнаружения биомаркеров [4].

Результаты мультиплексного анализа в одном образце выявляются с помощью двухлазерной системы и цифровой обработки сигналов на проточном флуоресцентном анализаторе [5]. Мультимаркерный анализ позволяет повысить чувствительность и специфичность диагностики и является одним из перспективных подходов к персонализации медицины [6].

Разработка и совершенствование таких нанотехнологических систем мультиплексного анализа, а также контроль их качества невозможны без использования современных методов мультимодальной микроскопии высокого разрешения. Чтобы охарактеризовать все наноструктурные свойства таких систем, необходимо при-

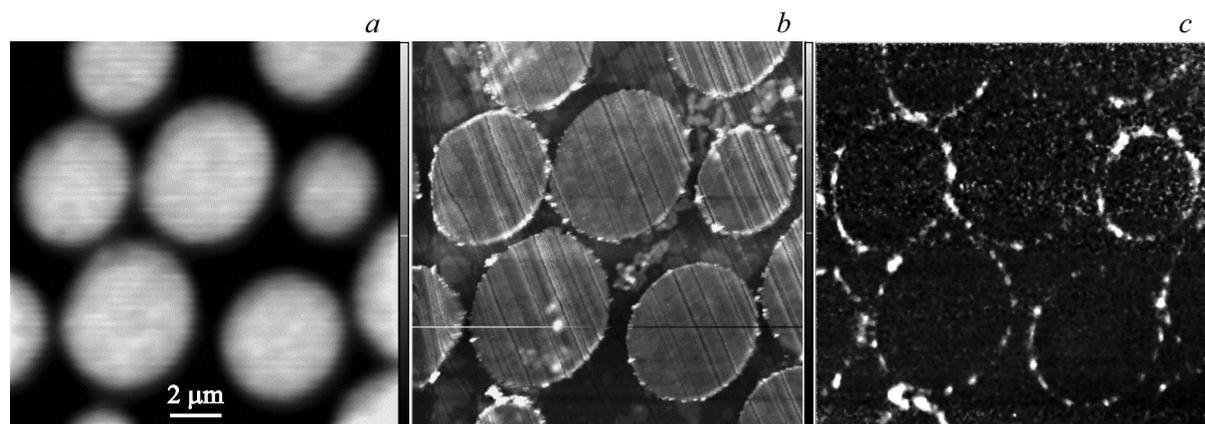


Рис. 1. Исследование образца микросфер Lumines 39 методом СЗМ–ОМ. *a* — флуоресцентное конфокальное изображение образца микросфер Lumines 39 в области 655 nm, размер скана $14 \times 14 \mu\text{m}$; *b* — топографическое СЗМ-изображение того же участка; *c* — МСМ-изображение того же участка.

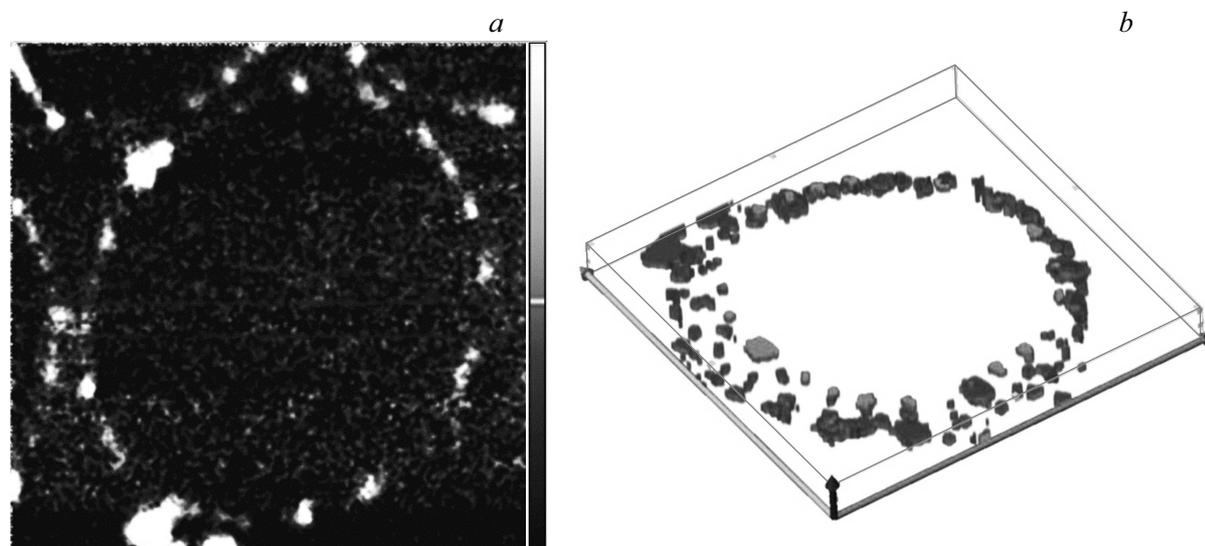


Рис. 2. *a* — СЗМ-изображение среза микросферы Lumines 39 с увеличенным разрешением, размер скана $7 \times 7 \mu\text{m}$; *b* — трехмерная реконструкция распределения магнитных наночастиц на поверхности микросферы Lumines 39, размер $7.0 \times 7.0 \times 1.0 \mu\text{m}$, десять срезов толщиной 100 nm.

менять ряд различных устройств и методов. Это делает анализ сложным и трудоемким.

Упомянутые выше трудности, возникающие при характеристике дисперсий полимерных частиц, особенно композитных, гибридных и многофункциональных, приводят к сложной задаче — разработке инструментального подхода, объединяющего возможности различных методов в одном устройстве. Измерение вязкоупругих, флуоресцентных, магнитных свойств с пространственным разрешением является основой для характеристики как гибридных, так и многофункциональных частиц. Сочетание в одном устройстве различных методов, не требующих дополнительных флуоресцентных меток, отвечающих за исследование всех свойств частиц и позволяющих осуществлять внутреннюю трехмерную

реконструкцию образца, представляет собой сложную задачу в области характеристики полимерных частиц, что приводит к необходимости разработки уникальных специализированных измерительных техник.

В связи с этим технология сканирующей зондовой нанотомографии–оптической микроскопии (СЗМ–ОМ) предоставляет уникальные возможности для анализа наноструктурных особенностей таких микросфер, имеющие решающее значение для обеспечения функциональности систем мультиплексного анализа [7,8]. Технология основана на сочетании ультрамикротомы, сканирующего зондового микроскопа (СЗМ) и оптического микроспектроскопа в одной системе, предназначенной для последовательных корреляционных измерений поверхности срезаемого образца с помощью ряда зондовых

и оптических методов в рабочем цикле среза ультрамикротомом. Это позволяет производить трехмерную реконструкцию наноструктур в объеме образца путем интеграции последовательных СЗМ- и оптических изображений ряда срезов образца с использованием уникальной научной установки — системы зондово-оптической 3D корреляционной микроскопии, созданной авторами настоящей работы (<http://ckp-rf.ru/usu/486825/>). Инструмент входит в состав оборудования ЦКП ИБХ РАН (проект RFMEFI62117X0018).

В настоящей работе исследованы структура и пространственная корреляция расположения области, маркированной флуоресцентным красителем, и области МНЧ внутри микросфер. В качестве объектов для исследований были выбраны микросферы серии Luminex 39 (Luminex Corp., Остин, Техас, США) с включениями МНЧ, используемые на практике в системах мультиплексной диагностики.

Целью исследования является изучение внутренней структуры микросфер, в частности распределения слоев, наночастиц и флуоресцентных красителей в объеме микросфер, а также оценка магнитных свойств обнаруженных наночастиц и спектров флуоресценции микросфер.

Изучение приготовленных образцов микросфер проводилось с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) в полуконтактном режиме и магнитно-силовой микроскопии (МСМ) в корреляции с конфокальной флуоресцентной микроскопией и спектроскопией.

Образцы встроенных в эпоксидную среду микросфер срезались с помощью ультрамикротомом Reichert-Jung Ultracut (Leica Microsystems GmbH, Вена, Австрия), интегрированного в систему СЗНТ–ОМ, с использованием алмазного ножа UltraAFM 35 (Diatome AG, Биль, Швейцария). Толщина срезов составляла 100 nm. Комбинированная система СЗНТ–ОМ подробно описана в работе [7]. Данная система включает в себя специализированные модули сканирующего зондового микроскопа и оптического микроскопа, позволяющие выполнять как зондовые, так и оптические измерения структур на поверхности образца непосредственно после сверхтонкого среза его поверхности алмазным ножом ультрамикротомом без дополнительных перемещений образца. В предположении, что распределения параметров и компонентов в объеме микросфер имеют сферическую симметрию, корреляционные измерения проводились на центральных срезах микросфер, встроенных в эпоксидные блоки.

Поверхность секционированного блока анализировалась с использованием АСМ (топография) и МСМ (распределение намагниченности); та же площадь ($14.0 \times 14.0 \mu\text{m}$) поверхности анализировалась с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии. Магнитные измерения осуществлялись в двухпроходном режиме: сканирование проводилось на первом проходе в полуконтактном режиме АСМ, на втором проходе магнитный зонд был поднят на 25 nm над поверхностью

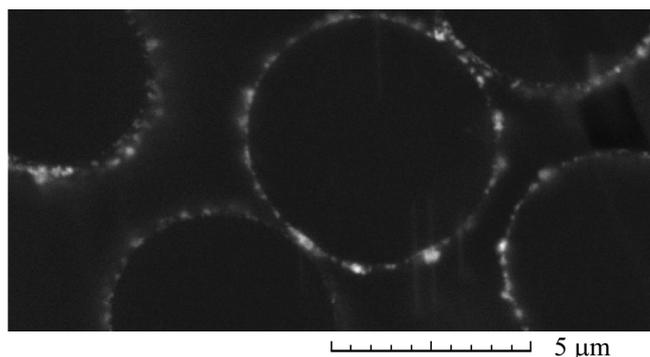


Рис. 3. СЭМ-изображение среза поверхности образца Luminex 39 в режиме обратного рассеяния электронов.

и было получено фазовое изображение, соответствующее картированию распределения намагниченности. Для МСМ-измерений были использованы магнитные кантилеверы ASYMFM (Oxford Instruments Asylum Research) с покрытием зонда CoCr и резонансной частотой 70 kHz. Для АСМ- и МСМ-измерений размер сканирования был установлен на 512×512 пикселей при частоте сканирования 0.8 Hz.

Чтобы получить трехмерное распределение магнитных свойств, МСМ-измерения затем повторялись 10 раз, каждое после выполнения среза ультрамикротомом толщиной 100 nm. Трехмерная реконструкция распределения намагниченности была визуализирована с помощью программного пакета Image Pro 6.0 Plus с опцией 3D Constructor (Media Cybernetics, Inc., США).

Для получения конфокальных изображений в режиме λ -сканирования флуоресцентный сигнал интегрировался в диапазоне ± 10 nm от максимума спектра флуоресценции с лазерным возбуждением 632.8 nm и мощностью $200 \mu\text{W}$. Размер области сканирования ($14 \times 14 \mu\text{m}$) совпадал с областью, исследуемой с помощью СЗМ, при этом в случае конфокальной микроскопии эта область была разделена на 100×100 пикселей, а время накопления составляло 0.2 s/px.

Микросферы Luminex 39 мечены двумя флуоресцентными красителями с различной длиной волны и интенсивностью флуоресценции. На рис. 1 показаны флуоресцентное конфокальное изображение в области длин волн 655 nm (a), а также корреляционные топографические СЗМ-изображения (b) и МСМ-изображения (c) сечения микросфер Luminex 39 на том же участке поверхности. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что в данном случае МНЧ располагаются только на поверхности полимерных микросфер, характеризующихся однородной структурой и равномерным распределением флуоресцентных красителей. На топографических СЗМ- и МСМ-изображениях с высоким разрешением (рис. 1, b, c) можно четко различить отдельные МНЧ и их кластеры. Необходимо отметить, что не все кластеры, присутствующие на СЗМ-изображении, демонстрируют

магнитный сигнал соответствующей силы. Это исключает артефакты перекрестных помех СЗМ/МСМ. Размеры отдельных МНЧ, согласно топографическому СЗМ-изображению высокого разрешения (рис. 2, *a*), находятся в диапазоне 20–100 nm. На рис. 2, *b* представлена трехмерная реконструкция распределения магнитных наночастиц на поверхности микросферы Lumipex 39, полученная в результате интегрирования десяти последовательных МСМ-изображений срезов образца толщиной 100 nm. Можно видеть, что МНЧ довольно равномерно распределены по сферической поверхности микросфер, хотя некоторые кластеры МНЧ все еще присутствуют. Плотность распределения МНЧ на поверхности микросферы можно оценить на уровне $25 \mu\text{m}^{-2}$.

На рис. 3 показано изображение того же образца микросфер Lumipex 39, полученное при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в режиме обратного рассеяния электронов. Данные СЭМ подтверждают результаты СЗМ- и МСМ-измерений, которые указывают на то, что металлосодержащие МНЧ расположены только на поверхности полимерных микросфер.

Таким образом, в работе впервые демонстрируется трехмерная реконструкция распределения наномангнитных свойств в микросферах, соответствующая данным АСМ-топографии и конфокальной флуоресцентной микроскопии. Представленные результаты демонстрируют, что методология СЗНТ–ОМ позволяет эффективно изучать трехмерное распределение флуоресцентных красителей и магнитных наночастиц в полимерных микросферах. Исследования различных полимерных, композитных, гибридных и биологических систем показывают, что с помощью режима фазовой визуализации СЗМ можно в то же время обнаружить трехмерное распределение гетерогенных полимерных соединений [9], получить информацию о морфологии трехмерных сетей нанопор [10], оценить локальную эластичность и электрические свойства нанокомпозитных и наногибридных материалов в объеме [11]. С учетом дальнейшего развития этой технологии с использованием всех имеющихся возможностей мультимодальной сканирующей зондовой микроскопии и оптической микроспектроскопии для корреляционного анализа технология СЗНТ–ОМ может стать мощным инструментом для мультимодальной нанохарактеризации различных типов полимерных частиц. Комбинация корреляционного трехмерного СЗМ-, МСМ- и оптического анализа также может быть использована в будущем для изучения локализации биосенсоров на основе МНЧ в анализируемых клетках и тканях с наноразмерным разрешением [12].

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Российского научно-го фонда (проект № 18-19-00718).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] *Generalova A.N., Zubov V.P.* // *Colloids Surf. B.* 2018. V. 166. P. 303–322.
- [2] *Bangs L.B.* // *Pure Appl. Chem.* 1996. V. 68. P. 1873–1879.
- [3] *Generalova A.N., Chichkov B.N., Khaydukov E.V.* // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017. V. 245. P. 1–19.
- [4] *Brazhnik K., Sokolova Z., Baryshnikova M., Bilan R., Efimov A., Nabiev I., Sukhanova A.* // *Nanomedicine: NBM.* 2015. V. 11. P. 1065–1075.
- [5] *Houser B.* // *Arch. Physiol. Biochem.* 2012. V. 118. P. 192–196.
- [6] *Yu X., Schneiderhan-Marra N., Joos T.O.* // *Clin. Chem.* 2010. V. 56. P. 376–387.
- [7] *Mochalov K.E., Chistyakov A.A., Solovyeva D.O., Mezin A.V., Oleinikov V.A., Vaskan I.S., Molinari M., Agapov I.I., Nabiev I., Efimov A.E.* // *Ultramicroscopy.* 2017. V. 182. P. 118–123.
- [8] *Bilan R.S., Krivenkov V.A., Berestovoy M.A., Efimov A., Agapov I.I., Samokhvalov P.S., Nabiev I., Sukhanova A.* // *ChemPhysChem.* 2017. V. 18. P. 970–979.
- [9] *Alekseev A., Efimov A., Loos J., Matsko N., Syurik J.* // *Eur. Polym. J.* 2014. V. 52. P. 154–165.
- [10] *Efimov A.E., Moisenovich M.M., Bogush V.G., Agapov I.I.* // *RSC Adv.* 2014. V. 4. P. 60943–60947.
- [11] *Alekseev A., Efimov A., Lu K., Loos J.* // *Adv. Mater.* 2009. V. 21. P. 4915–4919.
- [12] *Wu M., Huang S.* // *Mol. Clin. Oncol.* 2017. V. 7. P. 738–746.