

3. Demore, D. [et al.]. Enhancement of 5,10,15,20-Tetra(m-Hydroxyphenyl)chlorin Fluorescence Emission by Inclusion in Natural and Modified Cyclodextrins // Applied spectroscopy. 1999. № 53. P. 523-528.

ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЯЕНИЯ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК В КЛЕТКАХ

М. А. Яковлева, Е. Н. Голубева, М. В. Шуба

ВВЕДЕНИЕ

Углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой полые цилиндры, состоящие из одного или нескольких свернутых листов графена. УНТ рассматриваются в качестве перспективных материалов для нано- и молекулярной электроники, фотоники и медицины. Уникальные механические, оптические и электронные свойства УНТ определяют самые различные сферы их применения: в области полевых транзисторов, полимерных композитов, прозрачных проводников микроэлектромеханических систем нового поколения, средств адресной доставки лекарств и нуклеиновых кислот, визуализации опухолей, для оценки точности попадания препарата в органы и ткани.

Наиболее популярным и надежным методом диагностики является спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) света, которая известна как быстрый и неразрушающий способ определения структурных параметров различного рода наноструктур [1].

КОМБИНАЦИОННОЕ РАССЕЯНИЕ ДЛЯ УНТ

Спектроскопия КР наиболее чувствительна к высокосимметричным ковалентным связям с малыми или отсутствующими дипольными моментами. Углерод-углеродные связи полностью соответствуют этому критерию, поэтому спектроскопия КР способна обнаруживать мельчайшие изменения в структуре материала, что делает ее чрезвычайно ценным методом исследования [2].

Высокая интенсивность сигнала комбинационного рассеяния углеродной нанотрубки обусловлена резонансным характером взаимодействия УНТ с возбуждающим излучением. Спектр КР УНТ имеет несколько характерных и уникальных черт. Первой особенностью является G-полоса, $\sim 1590 \text{ cm}^{-1}$, связанная с оптическими колебаниями двух смежных атомов углерода в решетке нанотрубки. Второй важной особенностью спектров

КР углеродных нанотрубок является наличие в низкочастотной области, так называемой, радиальной дыхательной моды, $\sim 120\text{--}350\text{ см}^{-1}$, характерной только для нанотрубок и связанной с симметричными колебаниями атомов углерода в радиальном направлении. Частота колебаний этой моды ω_{RBM} обратно пропорциональна диаметру нанотрубки. Это соотношение позволяет характеризовать распределение нанотрубок по диаметрам в образце. Третьей особенностью является D-полоса $\sim 1350\text{ см}^{-1}$. Наличие данной области в спектре КР указывает на присутствие определенных дефектов в нанотрубках. Эти дефекты могут быть вызваны как несовершенствами решетки нанотрубки, так и наличием примесей. Также вклад в интенсивность этой полосы могут добавить краевые эффекты на концах УНТ. Относительная интенсивность этой полосы по сравнению с полосой G служит показателем качества нанотрубок. Для хороших образцов D полоса на несколько порядков меньше, чем G [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Распределение одно- и двустенных УНТ в клетках глиомы крысы линии C6 было исследовано *in vitro* с помощью конфокальной микроскопии комбинационного рассеяния. Для измерения использовался конфокальный микроскоп БГУ (NanoFinder High End, Tokyo Instruments). УНТ гидрофобны, поэтому их функционализируют различными биосовместимыми соединениями, что не дает им формировать агрегаты а также позволяет проникать через мембраны клеток. В эксперименте использовались короткие УНТ ($\sim 100\text{--}250\text{ нм}$), предварительно диспергированные в водном растворе БСА (бычьего сывороточного альбумина) или ДНК. Клетки линии C6 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, гентамицин (80 мг/мл), при температуре 37°C и 5% CO_2 . Часть культуральной среды в чашках Петри заменяли на полученную суспензию и культивировали клетки в присутствии УНТ. Распределение УНТ в клетках исследовали через 8 и 18 часов после добавления УНТ.

Картографирование клеток проводили с использованием следующих параметров конфокального микроскопа: возбуждение проводилось лазерным излучением с длиной волны 532 нм и 785 нм и мощностями 20 и 75 мВт, соответственно, время экспозиции составляло 1 с, шаг сканирования — 1.5 мкм, во избежание повреждения клеток были использованы нейтральные фильтры для снижения интенсивности лазерного излучения (выходная мощность лазера, при длине волны возбуждения 532 нм, была 600 мкВт). Примечательно, что для облучения используется видимый зеленый свет на длине волны 532 нм.

Клеточная жизнеспособность после процедуры культивирования с УНТ-БСА комплексами была определена с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии с использованием флуоресцентного красителя пропидия йодида (ПИ). ПИ не проникает через мембрану жизнеспособных клеток, накапливается только в погибших клетках, имеющих мембранные дефекты, и связывается там с нуклеиновыми кислотами. После связывания с нуклеиновыми кислотами его флуоресценция возрастает в 20-30 и более раз [4]. Так как ПИ связывается с ДНК, его использовали только для экспериментов с УНТ-БСА комплексами.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Обычно, спектроскопия КР проводится с использованием мертвых клеток, в нашем же случае исследуются живые клетки, а так как зеленый лазер может повлиять на жизнеспособность клетки, используется инфракрасный лазер, клеточная среда для которого является не поглощающей.

В результате были получены изображения, на которых отображался просканированный участок. Путем сопоставления их с изображениями просвечивающей микроскопии можно судить о проникновении УНТ в клетки и их локализации в них.

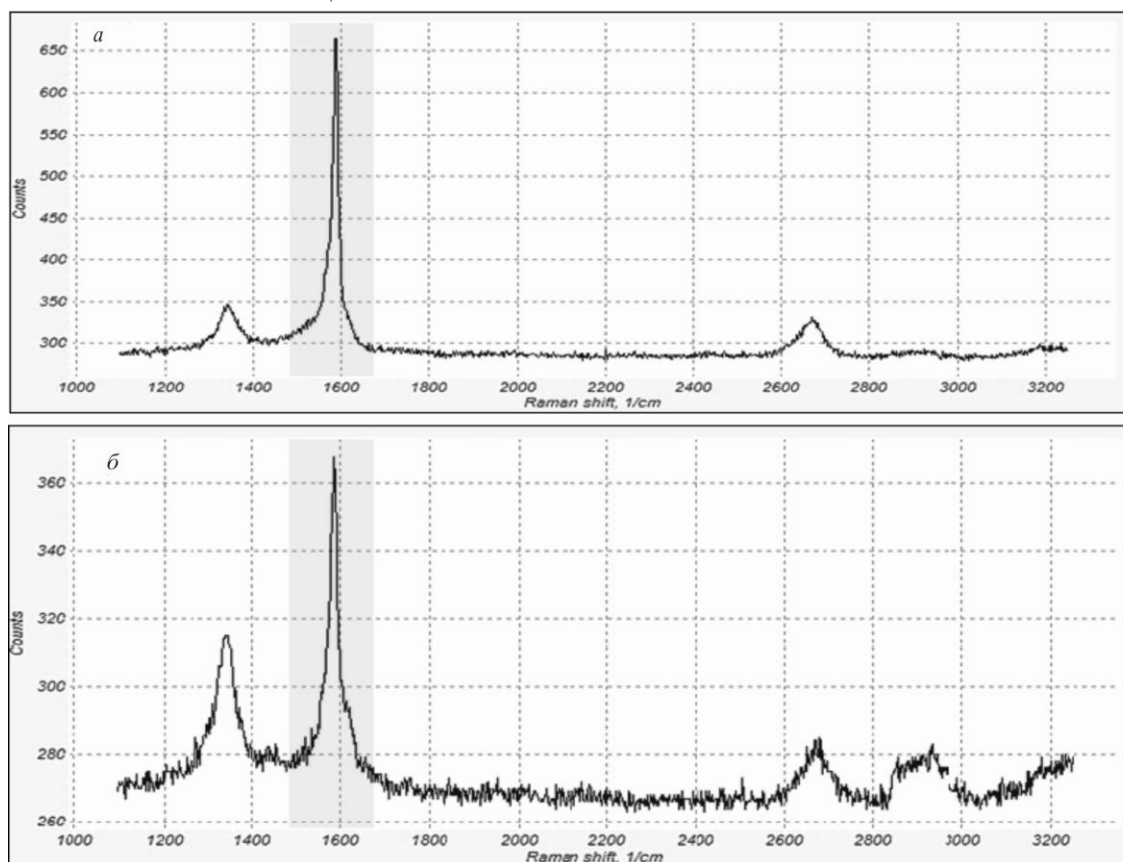


Рис. 1. Примеры полученных спектров КР

Используя программное обеспечение, можно наблюдать спектр определенной точки на изображении. Примеры экспериментальных спектров представлены на рис. 1. Сравнивая рисунки *а* и *б* можно судить о количестве, типе и дефектах УНТ.

В случае УНТ-БСА комплексов, как и в случае УНТ-ДНК комплексов, УНТ проникли в клетки, и неоднородно распределялись по ним. Проникновение в клетки комплексов УНТ-ДНК происходило быстрее.

Анализ с ПИ показал, что клетки на момент эксперимента оставались жизнеспособными. Таким образом, данный метод позволяет работать с отдельными живыми клетками, не повреждая их при этом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы была освоена техника приготовления суспензии, и культивация клеток в среде с УНТ. Подобрана нетоксичная концентрация УНТ, которая не влияет на жизнеспособность клеток глиомы крысы линии С6. Было исследовано распределение функционализированных УНТ в клетках глиомы С6 крысы и влияние УНТ-ДНК и УНТ-БСА комплексов на функционирование клеток. Показана эффективность применения КР для исследования одиночных клеток с распределенными в них углеродными нанотрубками.

Литература

1. Jorio A., Dresselhaus G., Dresselhaus M.S. «Carbon Nanotubes, Advanced Topics in the Synthesis, Structure, Properties and Applications// Topics in Applied Physics. 2008. V. 111.
2. С.Тихомиров, Т.Кимстач «Спектроскопия комбинационного рассеяния – перспективный метод исследования углеродных наноматериалов», С.1-2.
3. О.С.Тимофеев, Н.Г.Чеченин «Комбинационное рассеяние УНТ, полученных различными методами», "Аналитика", 1/201 1(1), С.28.
4. Интернет-адрес: <http://www.enzolifesciences.com/ENZ-52403/propidium-iodide-ultra-pure/>.