

## НОВЫЕ НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ФЛУОРОФОРЫ И СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ РЕТИНАЛЬ-СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ КАК ОСНОВА ЭЛЕМЕНТНОЙ БАЗЫ ДЛЯ КВАНТОВОЙ НАНОХИРУРГИИ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА

Обсуждается возможность восстановления зрения при дистрофических поражениях сетчатки путем введения квантовых точек и их взаимодействия со зрительными белками фоторецепторов. Ключевые слова: квантовые точки, сетчатка глаза, фоторецепторы.

### Актуальность

Общеизвестно, что катастрофически растет число людей в мире страдающих различными формами повреждения сетчатки, такими как пигментный ретинит, отслойка сетчатки, диабетическая ретинопатия и дегенерация желтого пятна, что ведет к снижению зрения и слепоте. Для восстановления потери зрения из-за повреждения сетчатки разработано много устройств. Например, рядом фирм были предложены фотоэлектрические устройства в виде цифрового чипа, размещенного на сетчатке для стимуляции ее фоторецепторов [1]. Хотя такие устройства и обеспечивают некоторую стимуляцию сетчатки, но они имеют существенные недостатки. В частности, устройства относительно большие (порядка нескольких квадратных миллиметров). В результате, помещенные в сетчатку эти устройства блокируют существенную часть света, который мог бы дойти до палочек и колбочек, расположенных позади устройства. Кроме того, внедрение устройств, как полагают, создает опасность повреждения ткани сетчатки.

В работе [2] предлагается технология восстановления потери зрения из-за повреждения сетчатки, основанная на инъекции массива коллоидных квантовых точек (КТ) в стекловидное тело глаза или субретинально в сетчатку. Этот молекулярный гибрид квантовых точек и зрительных белков сетчатки представляет собой уникальный усилитель зрения. Фотон света, попавший на КТ, за счет ферстеровского резонансного переноса энергии (так называемого FRET-эффекта) безызлучательно возбуждает физиологический процесс фототрансдукции [3,4], в результате которого формируется нервный импульс путем преобразования энергии света в электрический сигнал и

передачи этого импульса в соответствующие центры мозга, вызывая адекватные зрительные ассоциации. Эта фундаментальная задача и подход к ее решению иллюстрируют важность исследования молекулярных телекоммуникационных систем на основе современных наногибридных комплексов квантовая точка – светочувствительный ретиналь-содержащий белок фоторецепторов.

Квантовые точки – это физические объекты наноразмеров, в которых благодаря эффекту пространственного ограничения носителей зарядов проявляются квантовые свойства. Наиболее существенным является формирование флуоресцентных энергетических уровней (как у любого атома). Длина волны (частота излучения) эмиссии флуоресценции определяется расстоянием между энергетическими уровнями:  $\nu = \Delta E/\hbar$ .

Полупроводниковые КТ обычно синтезируют из элементов групп II–VI или III–V периодической таблицы, например: CdSe, CdTe или InAs. Для повышения эффективности флуоресценции обычно применяют КТ-структуры ядро/оболочка, в которых флуоресцирующее полупроводниковое ядро (например, из CdSe) покрывают оболочкой из другого полупроводника с более широкой запрещенной зоной (например, CdS или ZnS). Введение оболочки значительно улучшает флуоресцентные свойства КТ и их химическую устойчивость. Наиболее часто используемые сегодня нанокристаллы состоят из CdSe-ядра, покрытого ZnS-оболочкой, что определяется их высокой яркостью и высокими фото- и химической стабильностью. Варьируя размерами ядра КТ, можно «настроить» нанокристаллы на эмиссию флуоресценции любого цвета оптического диапазона. Важно, что КТ погло-

щают свет в широкой области спектра, включая УФ, преобразуя его во флуоресцентное излучение строго заданной длины волны. Спектральные линии эмиссии КТ симметричны, их ширина на полувысоте составляет обычно 25–30 нм. Возможность возбуждать КТ различных диаметров (различных цветов флуоресценции) светом одной длины волны открывает уникальные возможности для мультиплексирования. Кроме того, поверхностная химия нанокристаллов развита и позволяет формировать покрытия, содержащие функционализированные поверхностные слои для присоединения к ним биологических молекул и обеспечивающие биосовместимость нанокристаллов. В целом, это определяет потенциал применения КТ в биологии и медицине. По сравнению с органическими красителями, традиционно используемыми для маркировки биологических молекул, полупроводниковые КТ обладают рядом принципиальных преимуществ. Ключевой параметр в плане чувствительности метода – яркость метки, которая в 20–40 раз выше чем у органических и неорганических красителей. Именно поэтому высокочувствительные биомаркеры, разработанные на их основе, представляют альтернативу широко известным органическим красителям для диагностики заболеваний глаз [5, 6, 7].

### Цель

Теоретически обосновать выбор типа КТ, получить их и провести исследование характеристик и возможности размещения в полости глаза для стимуляции фоторецепторов сетчатки.

### Материалы и методы

Основой для исследования послужил вышеупомянутый ферстеровский резонансный перенос энергии – FRET-эффект (Fluorescence Resonant Energy Transfer), объясняющий механизм взаимодействия между флуорофорами.

При FRET-эффекте (рис.1) энергия, поглощенная донором (Д), которым является КТ, безызлучательно переносится на акцептор (А) – фоторецептор. Для этого спектры поглощения акцептора и донора должны перекрываться, а также акцептор и донор должны быть как можно больше сближены между собой. В против-

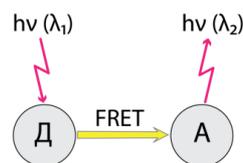


Рисунок 1

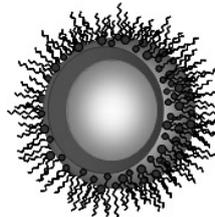


Рисунок 2. Схематическое изображение коллоидной квантовой точки типа ядро-оболочка с гидрофобной поверхностью. Внутри показано ядро из узкозонного полупроводника (InP), вокруг – оболочка из широкозонного полупроводника (ZnS), снаружи – органическая оболочка из поверхностно-активных молекул

ном случае эффективность FRET резко убывает. При соблюдении этих условий развивается интенсивная флуоресценция между донором и акцептором.

С учетом особенностей нелинейно-оптических свойств КТ, которые определяются поверхностным плазмонным эффектом, проводились расчеты их оптических и электродинамических характеристик.

### Результаты

С позиций физики твердого тела и электродинамики КТ представляют собой неорганические полупроводниковые нанокристаллы с уникальными оптикоэлектрическими свойствами, а именно: легко подстраиваемая длина волны флуоресценции, фотостабильность, высокий квантовый выход флуоресценции. Величина сечения экстинкции (поглощения) света на КТ определяется рассеянием и их интерференцией, а также эффективностью FRET-эффекта.

С использованием подходов теории Г. Ми [8] нами исследована зависимость сечения экстинкции КТ, состоящих из ядра и однослойной (двухслойной) оболочки, от размерного ряда КТ и типа окружающей матрицы в видимом диапазоне спектра. Установлены зависимости ширины пиков флуоресценции в механизме FRET, положения пиков резонансного поглощения от геометрических размеров ядра, оболочек КТ и диэлектрической проницаемости окружающей среды. Аналогичное исследо-

вание было проведено с новым типом безкадмиевых КТ на основе фосфида индия, которые имеют меньший квантовый выход флуоресценции и относительно низкую химическую токсичность.

Уникальные для офтальмологии КТ для наших исследований синтезированы в научно-технологическом и испытательном центре «Нанотех-Дубна». Эти КТ (рис. 2, цветная вкладка) покрыты гидрофильной кремний-органической оболочкой, которая выполняет защитную функцию и обеспечивает диспергируемость наночастиц в водной среде. Кроме того, функциональность поверхности КТ дает возможность их конъюгации с биомолекулами фоторецепторов. Максимум флуоресценции КТ лежит в зеленой области спектра на 520-530 нм, что практически соответствует спектру поглощения молекул родопсина дисков наружных сегментов фоторецепторов сетчатки. Вид спектральных характеристик возбуждения и излучения синтезированных КТ и их характеристики приведены на рис.3

За счет ковалентных связей между карбоксильными группами поверхностно-активных молекул на органической оболочке КТ и аминными концами наружной мембраны молекул родопсина дисков наружного сегмента палочек сетчатки, по нашим расчетам возникают реальные условия для эффективного переноса энергии от КТ к фоторецепторам.

Предпосылкой для данного исследования послужила работа [9], в которой изучалась возможность гибкого управления спектральными характеристиками комплекса КТ с ретиналь-содержащим белком бактериородопсином. В частности, квантовые точки позволили расширить спектральную чувствительность бактериородопсина, известного своей способностью использовать световую энергию для «перекачки» протонов через мембрану. Получающийся электрохимический градиент используется бактериями для синтеза АТФ.

Авторами был получен новый гибридный материал: присоединение квантовых точек к липидной мембране, содержащей плотно упакованные молекулы бактериородопсина, который расширяет диапазон фоточувствительности до УФ- и синей областей спектра, где «обычный» бактериородопсин не поглощает

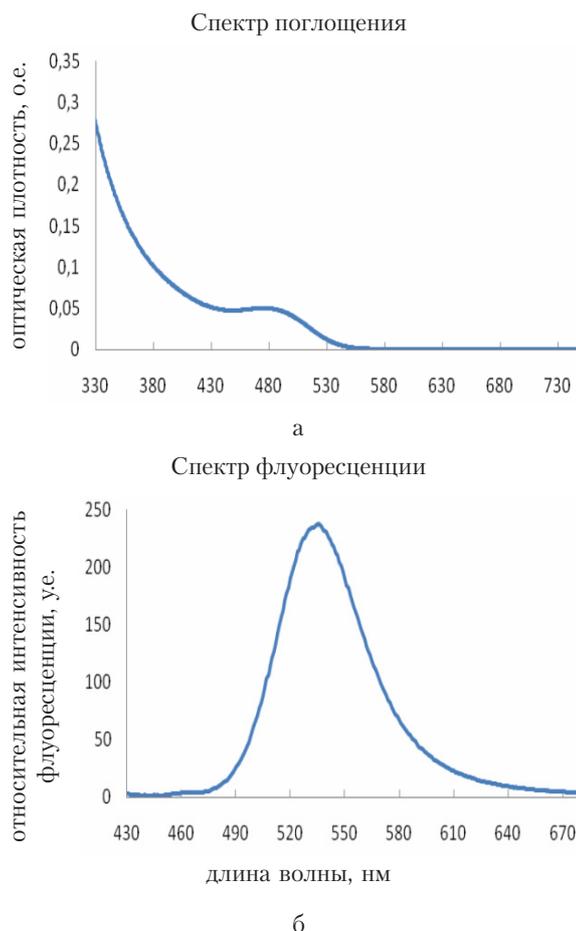


Рисунок 3. Спектры возбуждения (а) и излучения (б) КТ и их основные характеристики: тип: InP/ZnS (535 нм), растворитель: вода, лиганды: PEG-COOH, квантовый выход флуоресценции:  $\geq 21\%$

свет. Механизм передачи энергии бактериородопсину от КТ, поглощающей свет в УФ- и синей областях, все тот же: это FRET-эффект, акцептором излучения в этом случае выступает ретиналь – тот же самый пигмент, который работает в родопсине фоторецепторов сетчатки.

### Заключение

Таким образом, нами выбран тип и синтезированы КТ на основе фосфида индия, покрытые специальной оболочкой, которая обеспечивает защитную функцию и биосовместимость нанокристаллов с фоторецепторами сетчатки. Результаты исследования взаимодействия КТ с бактериородопсином убедительно подтверждают принципиальную возможность восстановления зрительных функций при поражениях сетчатки.

28.09.2012

**Список литературы:**

1. Zrenner E, Wilke R, Bartz-Schmidt K, Benav H, Besch D, Gekeler F, Koch J, Porubska K, Sachs H, Wilhelm B: Blind Retinitis Pigmentosa Patients Can Read Letters and Recognize the Direction of Fine Stripe Patterns With Subretinal Electronic Implants. IOVS 2009; 50, E-Abstract 4581.
2. Olson, J., (US patent), wo/2008/106605, «Method for stimulating retinal response using photoactive devices».
3. Freeman Ronit, Li Yang, Tel-Vered Ran, et al, «Self-assembly of supramolecular aptamer structures for optical or electrochemical sensing», Analyst, 2009, 134, -P. 653–656.
4. Igor L. Medintz and Hedi Mattoussi, «Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology», Phys.Chem.Chem.Phys., 2009, 11, P. 17–45.
5. Казайкин В.Н., Ремпель А.А., Разводов А.А., Кожевникова Н.С., Чашин Г.В. Возможности визуализации нанообъектов в витреоретинальной хирургии (предварительное сообщение) //Материалы XV научно-практической конференции офтальмологов, Екатеринбург, 2008, С.41-43.
6. Yamamoto S., Manabe N., Fujioka K., Hoshino A., Yamamoto K. Visualizing Vitreous Using Quantum Dots as Imaging Agents // IEEE Trans. NanoBioscience // 2007.-V.6.- №.1.- P. 94-98.
7. Smith AM, Duan H, Mohs AM, Nie S. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging // Adv Drug Deliv Rev. 2008.- V.17.- №11. P.1226-1240.
8. Cai W., Hofmeister H., Rainer T and Chen W. Optical properties of Ag and Au anoparticles dispersed within the pores of monolithic mesoporous silica // Journal of Nanoparticle Research, Vol. 3, 2001, P. 443-453.
9. Rakovich A., Sukhanova A., Bouchonville N., Lukashev E., Oleinikov V., Artemyev M., Lesnyak V., Gaponik N., Molinari M., Troyon M., Rakovich Y.P., Donegan J.F., Nabiev I. (2010). Resonance energy transfer improves the biological function of bacteriorhodopsin within a hybrid material built from purple membranes and semiconductor quantum dots. Nano Lett. 10, 2640–2648.

Сведения об авторах:

**Чашин Геннадий Викторович**, инженер отдела координации и развития медицинской деятельности  
ЗАО Екатеринбургский центр МНТК «Микрохирургия глаза», кандидат медицинских наук  
e-mail: cgv@eyeclinic.ru

**Пономарев Вячеслав Олегович**, клинический ординатор ЗАО Екатеринбургский центр  
МНТК «Микрохирургия глаза», e-mail: ponomarevsmolmed@mail.ru

**Носов Сергей Владимирович**, врач-офтальмолог II хирургического отд. ЗАО Екатеринбургский центр  
МНТК «Микрохирургия глаза», e-mail: nsvlab@yandex.ru

**Барыбин Александр Сергеевич**, научный консультант ЗАО Екатеринбургский центр  
МНТК «Микрохирургия глаза», кандидат медицинских наук, e-mail: bas\_p@mail.ru  
620149, г. Екатеринбург, ул. Бардина, 4а

**UDC 617.7-001.15**

**Chashchin G. V., Ponomarev V. O., Nosov S. V., Barybin A.S.  
NEW INORGANIC FLUOROPHORE AND PHOTSENSITIVE RETINAL-CONTAINING PROTEINS AS A BASIS  
OF ELEMENT BASE FOR QUANTUM NANOSURGERY OF EYE RETINA**

Possibility of restoration of sight at dystrophic defects of a retina by introduction of quantum dots and their interaction with visual proteins of photoreceptors is discussed.

Key words: quantum dots, eye retina, photoreceptors

**Bibliography:**

1. Zrenner E, Wilke R, Bartz-Schmidt K, Benav H, Besch D, Gekeler F, Koch J, Porubska K, Sachs H, Wilhelm B: Blind Retinitis Pigmentosa Patients Can Read Letters and Recognize the Direction of Fine Stripe Patterns With Subretinal Electronic Implants. IOVS 2009; 50, E-Abstract 4581.
2. Olson, J., (US patent), wo/2008/106605, «Method for stimulating retinal response using photoactive devices».
3. Freeman Ronit, Li Yang, Tel-Vered Ran, et al, «Self-assembly of supramolecular aptamer structures for optical or electrochemical sensing», Analyst, 2009, 134, -P. 653–656.
4. Igor L. Medintz and Hedi Mattoussi, «Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology», Phys.Chem.Chem.Phys., 2009, 11, P. 17–45.
5. Kazaykin V.N., Rempel A.A., Razvodov A.A., Kozhevnikova N.S., Chashchin G.V. Visualization possibilities of nanoobjects in vitreoretinal surgery (preliminary report) //Materials of XV research and practice conference of ophthalmologists, Ekaterinburg, 2008, P.41-43.
6. Yamamoto S., Manabe N., Fujioka K., Hoshino A., Yamamoto K. Visualizing Vitreous Using Quantum Dots as Imaging Agents // IEEE Trans. NanoBioscience // 2007.-V.6.- №.1.- P. 94-98.
7. Smith AM, Duan H, Mohs AM, Nie S. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging // Adv Drug Deliv Rev. 2008.- V.17.- №11. P.1226-1240.
8. Cai W., Hofmeister H., Rainer T and Chen W. Optical properties of Ag and Au anoparticles dispersed within the pores of monolithic mesoporous silica // Journal of Nanoparticle Research, Vol. 3, 2001, P. 443-453.
9. Rakovich A., Sukhanova A., Bouchonville N., Lukashev E., Oleinikov V., Artemyev M., Lesnyak V., Gaponik N., Molinari M., Troyon M., Rakovich Y.P., Donegan J.F., Nabiev I. (2010). Resonance energy transfer improves the biological function of bacteriorhodopsin within a hybrid material built from purple membranes and semiconductor quantum dots. Nano Lett. 10, 2640–2648.