Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

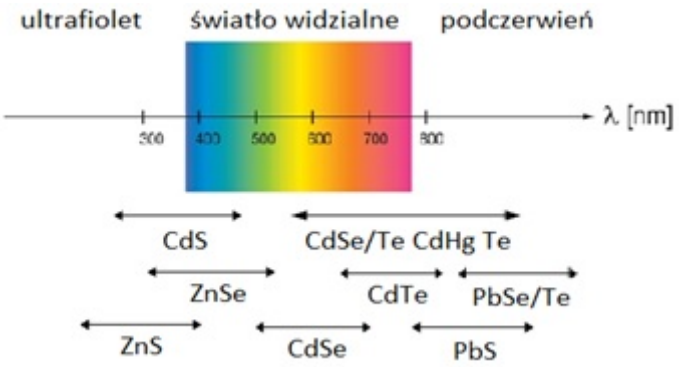
Zastosowanie kropek kwantowych w biologii i medycynie

Kropki kwantowe (ang. quantum dots - QD) są to półprzewodnikowe nanokryształy o wielkości od 2-10 nm. QD są bardzo specyficznym rodzajem substancji o właściwościach pośrednich pomiędzy półprzewodnikami i cząstkami kwantowymi. Ograniczona liczba atomów oraz średnica kilku nanometrów daje kropkom kwantowym wyjątkowe właściwości absorpcji i emisji promieniowania, które wynikają z występowania efektu ograniczenia kwantowego (ang. quantum confinemen effect). Oznacza to, że po wzbudzeniu energia emitowanych przez nie fotonów zależeć będzie od składu kryształu i jego wielkości. Podobnie jak półprzewodniki kropki kwantowe pochłaniają fotony światła o takiej energii,

która daje możliwość przeniesienia elektronów z poziomu niewzbudzonego na jeden z wyższych dostępnych poziomów energetycznych. Inaczej zachodzi proces emisji, gdyż długość fali emitowanego przez nie światła zależy od wielkości kropki. Stąd też mając jeden półprzewodzący materiał możemy otrzymać znaczniki mające różne kolory, stanowiące charakterystyczną cechę kropek kwantowych [1].

Nanocząsteczki o małej średnicy jądra (2 nm) charakteryzują się fluorescencją przy długości fali odpowiadającej światłu niebieskiemu, a nawet promieniowaniu ultrafioletowemu (UV). Gdy wzrasta średnica jądra kropki kwantowej, rośnie długość fali emitowanego promieniowania przez cały zakres światła widzialnego, aż po promieniowanie podczerwone (IR). Modyfikując skład i dobierając wielkości nanokryształów uzyskuje się fluorescencję w pełnym zakresie widma od ultrafioletu (UV) po podczerwień (IR) (Rys. 1) [2].

W celu otrzymywania kropek kwantowych wykorzystywane są różne związki pierwiastków grupy II oraz IV, na przykład: CdSe, CdTe, CdS_1CdHg, ZnS, a także grupy III i V, na przykład: InAs, InP, GaN, GaAs [2]. W mikroskopii fluorescencyjnej najczęściej wykorzystywane są związki pierwiastków składające się z selenku kadmu pokryte warstwą siarczku cynku (CdSe/ZnS), o zakresie emisji 450-650 nm i z tellurku kadmu (CdTe) mające zakres emisji 500-750 nm [1].



Rys. 1. Zakresy emisji promieniowania przez kropki kwantowe wykonane z różnych związków.

Promieniowanie może być absorbowane przez kropki kwantowe w szerokim zakresie widma, natomiast ich molowy współczynnik absorpcji wzrasta w kierunku promieniowania UV [2]. Dzięki temu można dokonać wzbudzenia wielu rodzajów kropek przy wykorzystaniu jednego źródła światła, gdyż nie ma wymogów stosowania promieniowania wzbudzającego o ściśle określonej długości fali. Z kolei profil emisji fluorescencji kropek kwantowych jest wąski i posiada małą wartość szerokości połówkowej (FWHM 125 nm). Umożliwia to równoczesne wykorzystywanie wielu znaczników mających różne kolory bez obawy o nakładanie się ich sygnałów. Nanokryształy mogą być wielokrotnie wzbudzane bez zauważalnego spadku ich fluorescjencji, gdyż mają wysoką kwantową wydajność fluorescencji (ang.quantum yield), a także długi czas emisji promieniowania (10-100 ns). Poza tym ich fluorescencja wykazuje dużą odporność na fotoblaknięcie (ang. photobleaching) [1].

Na początku lat 80. po raz pierwszy otrzymano struktury nazywane kropkami kwantowymi, ich nazwę (ang. quantum dots) zaproponował w 1988 r. Mark Reed. Ten dynamiczny rozwój technologiczny wpłynął na ogromny postęp w zakresie metodyki otrzymywania oraz zastosowania kropek kwantowych w wielu dziedzinach. Nagły wzrost badań w zakresie ich zastosowania w biologii oraz medycynie zaczął się od 1998 r. Opracowano wówczas syntezę rozpuszczalnych w wodzie kro-

pek kwantowych z przyłączonymi do ich powierzchni cząsteczkami biologicznymi. Ze względu na swoje właściwości, kropki kwantowe stanowią nową klasą znaczników, które wykorzystuje się w teragnostyce oraz w diagnostyce obrazowej [1].

Otrzymywanie kropek kwantowych

W jednym ze sposobów wytwarzania kropek kwantowych wykorzystuje się reakcję chemiczną pomiędzy jonami metalu na przykład kadmu i cząsteczkami mogącymi oddawać jony selenu, w wyniku czego powstaje selenek kadmu. Trudność tej metody polega na zapobieganiu zlepiania się małych kryształków przy ich wzroście do żądanych rozmiarów. Aby odizolować od siebie rosnące kryształki reakcja jest przeprowadzana w obecności czynnika powierzchniowo czynnego, czyli cząsteczek związków organicznych, które pokrywają powierzchnię każdego z rosnących kryształów. Cząsteczki te zapobiegają zrastaniu się kryształków, a także regulują szybkość ich wzrostu. Różne stężenia cząsteczek związków organicznych w roztworze mogą w pewnym stopniu kontrolować kształty kryształków. Otrzymywanie kropek kwantowych o jednorodnej strukturze oraz identycznych rozmiarach jest bardzo istotne, ponieważ rozmiary kropek decydują o ich własnościach optycznych, magnetycznych i elektrycznych. Zmiana czasu trwania reakcji i zastosowanie innych związków organicznych decydują o rozmiarze cząstek. Gdy nanocząstka jest niewielka, pokrycie jej powierzchni przez cząstki związków organicznych jest luźne, co umożliwia jej dalszy wzrost. Wraz ze wzrostem cząstki zacieśnia się pokrycie jej powierzchni. Istnieje pewna optymalna wielkość cząstki, która zapewnia najgęstsze ułożenie cząsteczek związków organicznych pokrywających powierzchnię, gwarantująca stabilizację powierzchni nanokryształków. Takie nanocząstki selenku kadmu są pierwszymi komercyjnymi produktami nanonauki [3].

Aby kropki kwantowe mogły być stosowane jako znaczniki fluorescencyjne muszą posiadać bardzo dobrą jakość, to znaczy powinny mieć wysoką monodyspersyjność i dużą kwantową wydajność fluorescencji. Monodyspersyjność świadczy o tym, że wszystkie kropki w danej próbce posiadają jednakową wielkość, co daje pewność otrzymania wąskiego pasma emisji fluorescencji. Monodyspersyjność i kwantowa wydajność fluorescencji zależą głównie od zastosowanej metody syntezy nanokryształów. W przypadku ogólnie używanych kropek kwantowych CdSe/ZnS, wykorzystuje się syntezę opartą na pirolitycznym rozkładzie metaloorganicznych prekursorów w mieszaninie organicznych rozpuszczalników koordynujących. Są nimi TOPO - tlenek trioktylofosfiny [$(C_8H_{17})_3PO$] i TOP - trioktylofosfina [$(C_8H_{17})_3P$]. Użycie tych rozpuszczalników daje pewność jednorodnej nukleacji w całej objętości reakcji, nie dopuszcza do agregacji tworzących się nanokryształów, jak również pozwala kontrolować kinetykę ich wzrostu [3]. Jako prekursory zawierające atomy budujące jądro kropki stosowane są dimetylokadm ($CdMe_2$) oraz selenek trioktylofosfiny [$(C_8H_{17})_3PSe$]. Synteza kropek kwantowych jest prowadzona dwuetapowo, w pierwszym etapie otrzymywane są kuliste jądra, a drugi polega na ich pasywacji warstwą półprzewodnika o szerszym paśmie wzbronionym, na przykład ZnS. W takiej reakcji prekursorami zewnętrznej warstwy może być między innymi siarczek bis(trimetylosilylu) [$(TMS)_2S$] i dietylocynk ($ZnEt_2$). Wzrost wydajności fluorescencji powoduje pasywacja jądra kropki kwantowej. Po syntezie powierzchnia kropek kwantowych jest pokryta hydrofobową warstwą TOPO/TOP. Aby otrzymać kropki kwantowe stosowane jako sondy fluorescencyjne w układach biologicznych trzeba zmodyfikować ich powierzchnię, tak aby mogły być rozpuszczalne w roztworach wodnych [4].

- Sprzęganie kropek kwantowych z cząsteczkami biologicznymi

Proces, który polega na przyłączaniu cząsteczek aktywnych do powierzchni kropek kwantowych, jest określany jako biokoniugacja bądź biosprzęganie. Warunkuje on zastosowanie sond fluorescencyjnych. Kwasy nukleinowe (np. siRNA), jak również różnego rodzaju białka oraz peptydy (np. przeciwciała), mogą być cząsteczkami przyłączanymi. Do sprzęgania na ogół używa się cząsteczek łącznikowych (ang. cross-linkers) bądź też biocząsteczki przyłącza się kowalencyjnie lub za pośrednictwem oddziaływań elektrostatycznych bezpośrednio do powierzchni kropki kwantowej [5].

Metoda polegająca na wykorzystaniu małych cząsteczek łącznikowych, łączy grupy funkcyjne kropki kwantowej z koniugowanymi biocząsteczkami. Cząsteczki łącznikowe powinny tworzyć wiązania kowalencyjne z grupami aminowymi, karboksylowymi oraz tiolowymi. Najczęściej stosowanym łącznikiem dla grup $–NH_2$ i -COOH jest EDC: l-etylo-3-[3-(dimetyloamino) propylo]karbodiimid. Jest to specyficzny rodzaj łącznika, gdyż ostatecznie sam nie zostaje wbudowany pomiędzy cząsteczki, które łączą się wiązaniem amidowym [5].

Bezpośrednio do powierzchni kropek kwantowych, są przyłączane białka albo peptydy głównie z wykorzystaniem powinowactwa znacznika polihistydynowego do atomów cynku lub innego metalu na powierzchni nanokryształu, bądź przez tworzenie wiązań pomiędzy atomami siarki na powierzchni kropki kwantowej a grupami tiolowymi reszt cysternowych koniugowanego polipeptydu. Przyłączenie peptydów do powierzchni nanokryształu zwiększa rozpuszczalność kropek kwantowych w roztworach wodnych, jak również wprowadza na powierzchnię grupy funkcyjne. Mogą one być wykorzystywane do dalszych modyfikacji [5].

Kolejna metoda biokoniugacji polega na współoddziaływaniu przeciwnie naładowanych cząsteczek. Po wymianie ligandów na przykładowo DHLA, kropka kwantowa ma ujemnie naładowaną powierzchnię, co skutkuje przyłączaniem się do niej białka o ładunku dodatnim. Takim białkiem jest awidyna, która w swojej budowie ma wiele zasadowych aminokwasów [5]. Podstawą do dalszej rozbudowy sondy fluorescencyjnej jest połączenie kropki kwantowej z awidyną. Wykorzystanie właściwości silnego wiązania się biotyny z awidyną bądź streptawidyną, umożliwia przyłączanie do powierzchni kropek kwantowych różnych biotynylowanych cząsteczek funkcjonalnych, na przykład przeciwciał [2].

W procesie sprzęgania biocząsteczek z kropkami kwantowymi, w przygotowywaniu znaczników fluorescencyjnych, pojawiają się pewne ograniczenia oraz problemy. Jednym z nich jest to, że nie można precyzyjnie kontrolować orientacji białek przyłączanych do powierzchni kropki kwantowej. Skutkiem tego jest, że część cząsteczek na powierzchni sondy nie spełnia swojej funkcji albo funkcja ta będzie zaburzona. Inny problem stanowi trudność w dokładnym kontrolowaniu ilości cząsteczek przyłączanych do powierzchni nanokryształu, co doprowadza do ograniczeń przy użyciu sond fluorescencyjnych do testów ilościowych [1].

Zastosowanie kropek kwantowych w biologii i medycynie

- Znakowanie komórek

Kropki kwantowe modyfikowane właściwymi ligandami mogą mieć zastosowanie w znakowaniu powierzchni komórek i struktur wewnątrzkomórkowych w preparatach utrwalonych, jak również w żywych komórkach. Właściwości kropek kwantowych umożliwiają długotrwałe monitorowanie znakowanego elementu, na przykład receptora. Na dokładne znakowanie struktur wewnątrzkomórkowych, począwszy od organelli po białka i kwasy nukleinowe pozwalają sondy fluorescencyjne

utworzone na bazie nanokryształów [1].

W badaniach biologicznych kropki kwantowe są wykorzystywane do śledzenia dynamiki recyrkulacji receptorów powierzchni błony komórkowej. Precyzyjność tego badania, wymaga wysokiej specyficzności sond fluorescencyjnych, a także możliwości śledzenia ich na poziomie pojedynczych cząsteczek. Obie te cechy są spełniane przez znaczniki na bazie kropek kwantowych. Na skutek właściwie nieograniczonej możliwości modyfikacji ich powierzchni można dostosować je do wykrywania różnych białek powierzchniowych. Natomiast wskutek charakterystycznego „mrugania" pojedynczych nanokryształów, które ukazuje się przy ciągłym wzbudzaniu fluorescencji, możliwe jest wskazanie pojedynczej cząsteczki. Badanie receptorów erbB/HER może stanowić przykład zastosowania kropek kwantowych w tej dziedzinie [4].

Dużym problemem przy znakowaniu elementów wewnątrzkomórkowych jest wprowadzenie kropek kwantowych do komórek. Bez trudu lecz najmniej wydajnie kropki kwantowe można wprowadzić do komórek przez ich pasywne przechodzenie przez błonę komórkową do cytoplazmy. Wydajność transportu kropek kwantowych przez błonę komórkową można zwiększać poprzez dołączenie do ich powierzchni ligandów wiążących się z receptorami powierzchniowymi błony komórkowej. Kropki kwantowe po przejściu przez błonę komórkową na drodze receptorowej bądź w sposób pasywny zamykane są w endosomach, co nie daje im możliwości swobodnego przemieszczania się wewnątrz komórki. Wykluczenie tego problemu następuje poprzez pokrycie powierzchni nanokryształu specjalną powłoką polimerową, która rozrywa endosomy. Kropki kwantowe są także wprowadzane do komórek w sposób mechaniczny - przez mikroiniekcję albo elektroporację. Pozytywny efekt jest uzyskiwany przy mikroiniekcji, strategia ta jednak wyklucza większą skalę badań. W przypadku elektroporacji, kropki kwantowe zwykle ulegają agregacji, a stosunkowo duża część znakowanych komórek umiera. Duże oczekiwania wiąże się z metodą polegającą na dołączaniu do powierzchni sond peptydów penetrujących błonę komórkową (ang. cell-penetrating peptides). Takimi peptydami są: poliarginina i białko Tat wirusa HIV. Stosowanie odpowiednich peptydów sygnałowych (ang. signal peptides) zapewnia, aby wprowadzone do wnętrza komórek kropki kwantowe mogły skutecznie, a także selektywnie znakować konkretne organelle. Zapewniają one wybiórczą translokację sond do wybranego kompartymentu komórki [6].

Wiele istotnych informacji dostarcza znakowanie komórek sondami, skonstruowanymi w oparciu o kropki kwantowe oraz ich monitorowanie. Ta technika jest ważna zwłaszcza w przypadku badania embriogenezy, gdyż umożliwia dokładne wskazanie segmentów oraz struktur zarodka wywodzących się z określonych komórek. Duże oczekiwania pokłada się w zastosowaniu kropek kwantowych w onkologii do obserwowania migracji komórek w obrębie zmiany nowotworowej i w monitorowaniu przemieszczania komórek przerzutujących. W powyższych zastosowaniach odpowiednie sondy fluorescencyjne muszą posiadać szczególne cechy. Wskazane jest by pozostawały w obszarze wyznakowanej komórki, nie zaburzały jej funkcjonowania oraz aby w trakcie podziału komórkowego równomiernie rozdzielały się do komórek potomnych. Poza tym sondy fluorecencyjne powinny mieć dużą odporność na fotoblaknięcie, w celu ich monitorowania przez dłuższy czas. Kropki kwantowe znakomicie sprawdzają się w śledzeniu migracji komórek, gdyż wykazują te wszystkie właściwości. Kropki kwantowe znalazły zastosowanie w biologii jako znaczniki białek i kwasów nukleinowych w strukturach tkankowych [6].

- Nanosensory

Obecnie obiecującą i dynamicznie rozwijającą się dziedziną biotechnologii jest opracowywanie metod otrzymywania nanosensorów. Istotne zastosowanie biosensorów polega na ich wykorzystaniu do wykrywania związków chemicznych, monitorowaniu reakcji na poziomie cząsteczkowym oraz przekazywaniu w sposób ciągły informacji o zmianach stężenia substratów. Kropki kwantowe są idealną bazą do konstruowania biosensorów ze względu na ich właściwości, łatwość wzbudzenia,

długi czas fluorescencji i możliwość przyłączania do powierzchni różnych cząsteczek [7].

Biosensory oparte na nanokryształach mają wspólną cechę, jest nią wykorzystywanie zjawiska rezonansowego przeniesienia energii wzbudzenia (ang.fluorescence resonance energy transfer - FRET). FRET jest to zjawisko polegające na przeniesieniu energii pomiędzy donorem a akceptorem. Przebieg tego procesu następuje w taki sposób, że wzbudzony donor przekazuje swoją energię akceptorowi, emitującemu ją w formie fluorescencji. W wyniku zastosowania promieniowania o długości fali wzbudzającej jeden z fluoroforów, uzyskuje się emisję z drugiego. Najefektywniej proces transferu energii zachodzi, gdy odległość między donorem a akceptorem jest mniejsza niż promień Fóstera, czyli mniej niż 10 nm. Optymalny efekt transferu energii osiąga się, gdy odległość pomiędzy donorem a akceptorem wynosi od 2 do 6 nm. Im większa jest odległość między fluoroforami, tym mniej energii jest przekazywanej przez FRET. Natomiast energia, która nie jest przekazana do akceptora, wprowadzana jest przez donor w formie fluorescencji. FRET wykorzystuje się w badaniach zmian konformacji białek oraz interakcji między nimi, gdyż znakomicie nadaje się do obserwowania zmian odległości pomiędzy badanymi elementami. Obecnie, są już doświadczalne układy nanosensorów, które wykorzystują kropki kwantowe i umożliwiają wykrywanie na przykład obecności maltozy, aktywności proteaz czy też określonych sekwencji DNA [7].

- Dostarczanie i monitorowanie uwalniania leków

Istotne znaczenie ma opracowywanie właściwych nanocząsteczkowych nośników leków, które umożliwią selektywne dostarczenie leku do patologicznych komórek, jak również ochronę aktywnego związku w krwiobiegu przed degradacją. Bardzo dobrym przykładem nanomateriału są kropki kwantowe. Na ich bazie zachodzi możliwość tworzenia układów dostarczających leki i równocześnie umożliwiających monitorowanie ich dystrybucji w organizmie. Przykładami zastosowania kropek kwantowych jako nośników leków są badania nad dostarczaniem doksorubicyny do komórek raka gruczołu krokowego. Kropki kwantowe są też wykorzystywane jako element układu monitorującego wygaszanie ekspresji genów przy pomocą siRNA [6].

- Obrazowanie in vivo

Zasadniczym elementem diagnostyki medycznej jest obrazowaniein vivo komórek bądź tkanek patologicznych. Dotychczas wykorzystywane metody obrazowania, nie pozwalają na monitorowanie zmian na poziomie komórkowym. Dlatego też zastosowanie w przyszłości znaczników fluorescencyjnych mogłoby uprecyzyjnić diagnostykę obrazową. W związku z tym należałoby najpierw rozwiązać wiele problemów, pojawiających się przy próbach użycia technik fluorescencyjnych w celu analizy całego organizmu, a które nie występują bądź nie mają ważnego znaczenia w badaniu komórekin vitro. Złożoność struktury narządów powoduje, że większa część promieniowania widzialnego jest pochłaniana bądź rozpraszana, natomiast wzbudzanie sond fluorescencyjnych może przyczyniać się do zwiększania autofluorescencji tła w szerokim zakresie widma. Jednak wykazano, że w bliskiej podczerwieni istnieje przedział promieniowania (700-900 nm), w którym zakłócenia tła i absorpcja sygnału przez tkanki sąniewielkie, co umożliwia wykonanie analizy o dużej rozdzielczości (ang.deep-tissue optical imaging). Postępowe badania koncentrują się na opracowywaniu nanoczasteczkowych nośników sond fluorescencyjnych, a przede wszystkim sond konstruowanych na bazie kropek kwantowych, które mogą być przydatne w obrazowaniu wnętrza organizmu [8].

Najczęstszą metodą podawania znaczników fluorescencyjnych w obrazowaniu in vivo jest ich wstrzyknięcie dożylne. Konieczność wprowadzenia do organizmu, dożylnym zastrzykiem, zawartych

w kropkach kwantowych szkodliwych metali ciężkich lub innych nanomateriałów nasuwa wiele wątpliwości. Wprawdzie ilość tych metali jest znikoma, lecz tempo ich wydalania z organizmu i ich ewentualny wpływ na organizm wymagają dalszych badań. Obserwuje się też szybką eliminację sond z układu krwionośnego w wyniku ich opsonizacji i fagocytozy. Istnieje także możliwość adsorpcji nanosond na powierzchni elementów morfotycznych krwi lub na komórkach śródbłonka. Z kolei u bardzo małych cząstek (~ 9 nm) może dojść do ich bezpośredniego wynaczynienia. Dotychczas udało się znacznie wydłużyć czas przebywania kropek kwantowych w krwiobiegu, pokrywając je powłoką zawierającą glikol polietylenowy (PEG). Mimo wszystko zabieg ten nie wyeliminował procesu niespecyficznego usuwania wprowadzonych cząsteczek [2]. Przyłączenie do powierzchni sond odpowiednich ligandów naprowadzających, przykładowo przeciwciał w połączeniu z powłoką mającą PEG, umożliwia dostarczenie pokaźnej części znaczników fluorescencyjnych do wybranych komórek. Jeśli chodzi o guzy nowotworowe, to budowa nowo powstałych okołonowotworowych naczyń krwionośnych sprzyja biernemu gromadzeniu się w nich nanocząstek wskutek zwiększonej przepuszczalności tych naczyń (ang. effect EPR) [1].

Kropki kwantowe mogą znaleźć zastosowanie w obrazowaniu in vivo w zakresie promieniowania widzialnego, jak i bliskiej podczerwieni (NIR). Jest nim wąskie, symetryczne pasmo emisyjne oraz szerokie pasmo absorpcyjne. Pierwsza z tych cech umożliwia oddzielenie sygnału sondy fluorescencyjnej od autofluorescencji tła przy użyciu analizy sygnału z zastosowaniem właściwych algorytmów komputerowych. Z kolei druga właściwość pozwala na dobranie długości fali promieniowania wzbudzającego, tak aby jak najmniej wzbudzić otoczenie kropki kwantowej, co wpływa na zmniejszenie nasilenia zakłóceń. Przykładem wykorzystania obu tych cech w systemie obrazowania może być testowane na modelach zwierzęcych znakowanie komórek raka stercza za pomocą sond z przyłączonym przeciwciałem anty-PSMA [9].

Inną metodą redukcji szumów jest użycie samowzbudzających się nanoukładów, które nie wymagają zewnętrznego źródła promieniowania. Nanoukłady są zbudowane z kropki kwantowej wykorzystującej bioluminescencję. Takie sondy są wzbudzane przez zjawisko BRET, którego mechanizm jest analogiczny do FRET, różnicę stanowi jedynie fakt, że w zjawisku BRET energia donora pochodzi z reakcji chemicznej, którą donor katalizuje (bioluminescencja). W BRET donorami są białka emitujące światło, na przykład lucyferyna, powstająca w wyniku utlenienia przez lucyferazę. Dla zapewnienia bezpiecznej analizy, nieuniknione będzie opracowanie systemów wzbudzających składających się z substancji nieimmunogennych, gdyż wprowadzenie do organizmu człowieka lucyferyny bądź lucyferazy może doprowadzić do odpowiedzi układu immunologicznego [9].

Podsumowanie

Obecnie kropki kwantowe wykorzystywane są w różnych procesach technologicznych oraz jako nanoznaczniki w technice i medycynie. Ze względu na swoje właściwości posiadają duży potencjał jako znaczniki fluorescencyjne nowej generacji dla sond DNA i przeciwciał monoklonalnych oraz systemów wizualizacji. Charakteryzują się szerokim spektrum absorpcji oraz wąskim emisji, co pozwala na jednoczesne wzbudzenie kilku rodzajów kropek kwantowych przez jedną długość fali. Są też znacznie bardziej stabilnymi i precyzyjnymi znacznikami, niż stosowane dotychczas w diagnostyce medycznej barwniki organiczne. Naukowcy podkreślają, że osiągnięte wyniki to tylko początek wszystkich możliwości metody oznaczania immunofluorescencyjnego z wykorzystaniem kropek kwantowych. Gdy zastosujemy kropki kwantowe jako znaczniki to testy biologiczne na obecność bądź aktywność poszukiwanych substancji są zdecydowanie czulsze, szybsze

i elastyczniejsze. Mogą także służyć do optycznego rozpoznawania składu genetycznego badanej próbki przez wytworzenie widmowych kodów paskowych. Tak uzyskane testy genetyczne mogą okazać się pomocne w wykryciu choroby we wczesnym stadium, czyli w momencie łatwiejszym do wyleczenia.

Należy zwrócić uwagę na to, że kropki kwantowe nie są pozbawione wad. Badania potwierdzają ich cytotoksyczny wpływ na komórki, jednak jednoznaczna ocena krótko i długoterminowej toksyczności kropek kwantowych jest na razie trudna. Brak jest dobrze dopracowanych testów analizujących wpływ nanomateriałów na żywe komórki. Dotychczas zgromadzone dane otrzymano z eksperymentów prowadzonychin vitro oraz in vivo, w których używano sondy mające różną budowę oraz podawane w różnych dawkach i w różny sposób. Najczęściej wykorzystywane kropki kwantowe (CdSe/ZnS, CdTe) zawierają dwuwartościowy kadm, który jest silnie neurotoksyczny. Na poziomie komórkowym wiąże się on z grupami tiolowymi białek i zaburza ich funkcje. Problem toksyczności jonów metali ciężkich można po części zredukować poprzez stosowanie dodatkowych powłok, a szczególnie polimerów o dużej masie cząsteczkowej, które pokrywają jądro nanokryształu. Prowadzone są także badania nad syntezą kropek kwantowych z mniej toksycznych metali, na przykład InP/ZnS czy $CuInS_2$/ZnS. Istotny problem z zastosowaniem kropek kwantowychin vivo stanowi sama obecność cząstek tej wielkości w organizmie, ponieważ nawet gdy są one całkowicie obojętne chemicznie, mogą odkładać się na powierzchni komórek lub w ich wnętrzu, zaburzając ich funkcjonowanie. Na podstawie obserwacji stwierdzono, że kropki kwantowe o wielkości poniżej 3 nm lokalizują się w jądrze komórkowym, gdzie mogą się niespecyficznie wiązać z histonami bądź nukleosomami. Z kolei przy podaniu dożylnym większa część pochłoniętych kropek gromadzi się w wątrobie, która wykazuje wrażliwość na metale ciężkie. Problem ten może rozwiązać zaprojektowanie sond fluorescencyjnych w taki sposób, aby mogły być szybko wydalane z organizmu. Według przeprowadzonych badań wynika, że wielkość graniczna cząstek, pozwalająca na wydalenie przez nerki wynosi 5,5 nm, a używane w badaniach kropki kwantowe, po pokryciu stabilną powłoka polimerową z dołączonymi peptydami sygnałowymi lub przeciwciałami przekraczają tę wielkość. Nieodzowne jest przygotowanie takich metod otrzymywania sond fluorescencyjnych na bazie kropek kwantowych, aby po wykonaniu swojego zadania elementy zewnętrzne mogły być odłączone bądź zdegradowane, a pozostała część miała średnicę mniejszą niż 5,5 nm. Ponadto porównując kropki kwantowe z innymi znacznikami fluorescencyjnymi można zauważyć, że są one drogie i trudniej dostępne, nie można ich umieszczać we wszystkich interesujących elementach komórki, zawierają toksyczne metale ciężkie, a także są izotropowe, w związku z czym spektroskopia polaryzacyjna ma w ich przypadku małe zastosowanie.

Jednak liczba zalet kropek kwantowych znacząco przewyższa ich wady. Mają one możliwość wzbudzania kropek o różnym widmie emisji falą o tej samej długości, w związku z czym aparatura wykorzystywana do badań jest tańsza a eksperyment łatwiejszy. Poza tym kolejnymi zaletami są wąskie pasma emisji, które mogą być łatwo wzbudzane krótszymi falami świetlnymi, duża trwałość przy przechowywaniu oraz oświetleniu, jak również długie czasy zaniku emisji. Przedstawione zalety pozwalają na to, że kropki kwantowe mogą znaleźć szerokie zastosowanie w biologii, biotechnologii i medycynie. W miarę prosty sposób modyfikowania powierzchni kropek kwantowych daje możliwość dostosowywania ich do określonych potrzeb i umożliwia niewyczerpane możliwości ich zastosowań. Aktualnie na rynku są dostępne kropki kwantowe z przyłączonymi cząsteczkami steptawidyny, co pozwala na modyfikacje przez dołączanie biotynylowanych ligandów. W przyszłości znaczniki i biosensory oparte na kropkach kwantowych mogą być niezbędnym narzędziem w mikroskopii fluorescencyjnej w badaniachin vitro iin vivo. Wszystkie te argumenty wskazują na fakt, że odkrycie kropek kwantowych może stać się przełomem w diagnostyce medycznej.

Autor: Katarzyna Czuba

Literatura:

1.Smith A.M., Duan H., Mohs A.M., Nie S. (2008) Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging, Adv. Drug. Deliv. Rev. 60, 1226-1240.

2.Jamieson T., Bakhshi R., Petrova D., Pocock R., Imani M., Seifalian A.M. (2007) Biological applications of quantum dots, Biomaterials. 28, 4717-4732.

3.Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. (1993) Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E=S, Se, Te) semiconductor nanocrystallites, **J. Am. Chem. Soc.** 115, 8706-8715.

4.Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H. (2005) Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, Nat. Mater.*4, 435-446.*

5.Sapsford K.E., Pons T., Medintz I.L., Mattoussi H. (2006) Biosensing with luminescent semiconductor quantum dots, **Sensors.**6, 925-953.

6.Gao X.H., Yezhelyev M.V., Qi L., O'Regan R.M., Nie S.M. (2008) Proton-sponge-coated quantum dots for siRNA delivery and imaging**, J. Am. Chem. Soc.** 130, 9006-9012.

7.Medintz I.L., Clapp A.R., Mattoussi H., Goldman E.R., Fisher B., Mauro J.M. (2003) Self-assembled nanoscale biosensors based on quantum dot FRET donors, Nat. Mater. 2, 630-638.

8.Zrazhevskiy P., Gao X. (2009) Multifunctional quantum dots for personalized medicine, Nano Today. 4, 414-428.

9.Gao X.H., Cui Y.Y., Levenson R.M., Chung L.W.K., Nie S.M. (2004) In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots, Nat. Biotechnol. 22, 969-976

10. http://archive.nrc-cnrc.gc.ca/eng/multimedia/quantum-dots.html

http://laboratoria.net/artykul/21025.html

Informacje dnia: Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód

podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób

Partnerzy