

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ КРАСИТЕЛИ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ CDSE/ZNS

Копыцкий А. В., Хильманович В. Н., Бич Н. Н., Шиман О. В.,
Басинский В. А., Шульга А. В.

Гродненский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

Актуальность. В последние десятилетия в связи с развитием нанотехнологий, в том числе и в области производства наночастиц с заданными свойствами, происходит расширение их применения. Морфология не стала исключением, и в настоящее время активно изучаются перспективы использования некоторых наночастиц для окрашивания гистологических препаратов. Потенциальным преимуществом наночастиц является то, что их поведение (например, яркость и цвет их излучения) может зависеть от микроокружения. Так, эксперименты показывают, что наночастицы CdSe/ZnS могут изменять спектр своей люминесценции, находясь в различных pH-окружениях [1]. Морфологические изменения в тканях должны сопровождаться и метаболическими изменениями, что, теоретически, должно приводить и к некоторым отклонениям в распределениях pH. Следовательно, такие распределения в неизмененных тканях, в органах с дисплазией и опухолевым ростом должны различаться. Поэтому визуально отображённые pH-распределения должны иметь разный вид, кроме этого, спектры люминесценции наночастиц CdSe/ZnS также должны иметь определённое сходство в случае совпадения морфологических заключений для тканей.

Цель. Визуализировать распределения pH по спектрам люминесценции наночастиц CdSe/ZnS, а также проверить гипотезу о сходстве этих спектров в случае совпадения результатов патогистологических исследований.

Материалы и методы исследования. При получении детальных спектров люминесценции наночастиц CdSe/ZnS во многих точках гистологических образцов был использован конфокальный микроскоп «NanoFinder 30», работающий в режиме сканирования (диапазон регистрации длин волн: 480-800 нм). В качестве гистологических препаратов использовались следующие образцы: 8390, 13920, 25020, 32205 (злокачественные опухоли); 27583, 28272, 51074 (дисплазия); 11589, 16286 (здоровые ткани), окрашенные наночастицами CdSe/ZnS по оригинальной методике.

Окраска гистологических срезов проводилась на кафедре патологической анатомии Гродненского государственного медицинского университета. Фиксация материала проводилась в универсальном растворе для гистологических исследований морфологического материала (забуференном формалине) в течение 24 часов. Серийные срезы толщиной 4 мкм были приготовлены из парафиновых блоков и смонтированы на подготовленных стеклах (толщиной 0,17 мм). На срезы, очерченные восковым карандашом,

наносили 150-200 мкл предварительно подготовленных растворов с наночастицами и помещали на 12 часов в темную увлажненную камеру при 4°C. После удаления и двукратного промывания в трисбуфере (pH 7.4) срезы обезживали в спирте, обрабатывали ксилолом и заключали в монтирующую среду.

Окрашивание образцов по результатам сканирования их спектров люминесценции проводилось программно [2]. Для этого использовались спектры люминесценции наночастиц CdSe/ZnS, записанные в различных pH-окружениях (pH: 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10) – так называемые эталонные спектры. Далее в каждой точке образца определялось, к какому эталонному спектру ближе спектр излучения в данном месте, для чего использовалось специальная мера расстояния между спектрами – дистанция Канберры. Точка относилась к тому типу pH, для которого расстояние Канберры было наименьшим.

Определение степеней схожести спектров образцов с идентичными патогистологическими заключениями производилось путём определения дистанций Канберры между усреднёнными спектрами образцов. Усреднение осуществлялось нахождением средней интенсивности на каждой длине волны.

Результаты и обсуждение. На рисунках ниже представлены результаты программного окрашивания образцов:

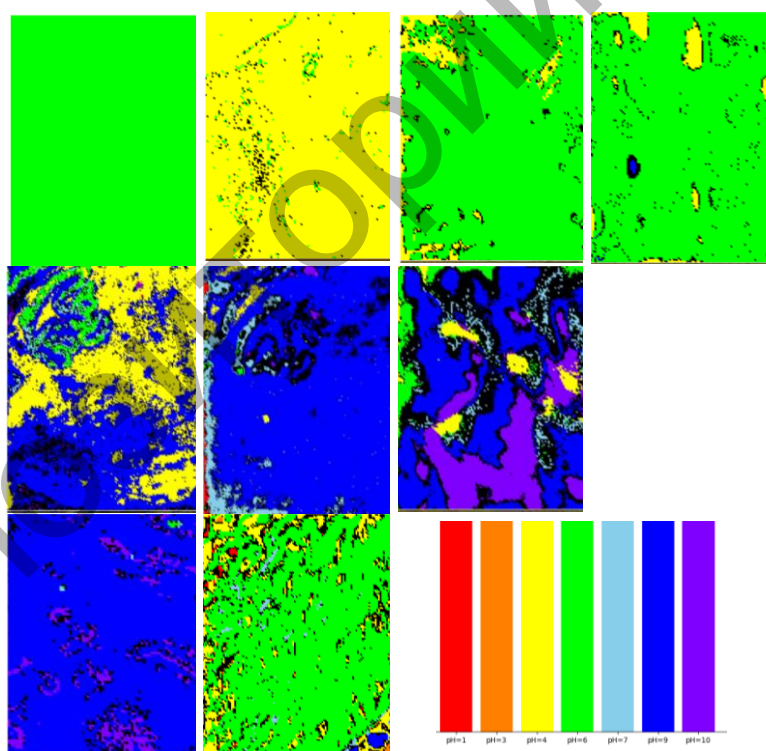


Рисунок 1 – Результаты программного окрашивания гистологических образцов (сверху вниз, слева направо):

1-й ряд – образцы: 8390, 13920, 25020, 32205;

2-й ряд – образцы: 27583, 28272, 51074;

3-й ряд – образцы: 11589, 16286 и цветовая схема pH

Как видно из приведённых изображений, в поражённых тканях наблюдалось снижение рН по сравнению с участками с дисплазией. Так, в образцах 8390, 13920, 25020, 32205 преобладали жёлтый («рН=4») и зелёный («рН=6») цвета, а при дисплазии (образцы 27583, 28272, 51074) присутствовал синий, голубой и фиолетовый цвета («рН=7», «рН=9», «рН=10», соответственно). Очевидно, что в данном случае, это не истинные рН в тканях, а их модельные значения. Это объясняется тем, что эталонные спектры наночастиц CdSe/ZnS записаны в кислоте, дистиллированной воде и щёлочи, а не в живых клетках, кроме того, живые ткани имеют механизмы поддержания необходимого уровня рН. Поэтому в данном случае жёлтый и зелёный цвета на окрашенных срезах корректнее интерпретировать как «рН ниже нормального», голубой и синий – «рН в норме», фиолетовый – как «рН выше нормального». Отметим, что образец 16286 противоречит нашему предположению о снижении рН при патологическом изменении ткани, что требует отдельного изучения.

Сходство спектров гистологических препаратов, о которых сделано единое патогистологическое заключение, подтверждается результатами многомерного шкалирования. На рисунках ниже приведены результаты его применения для усреднённых спектров образцов (для увеличений объектива $\times 10$ и $\times 40$):

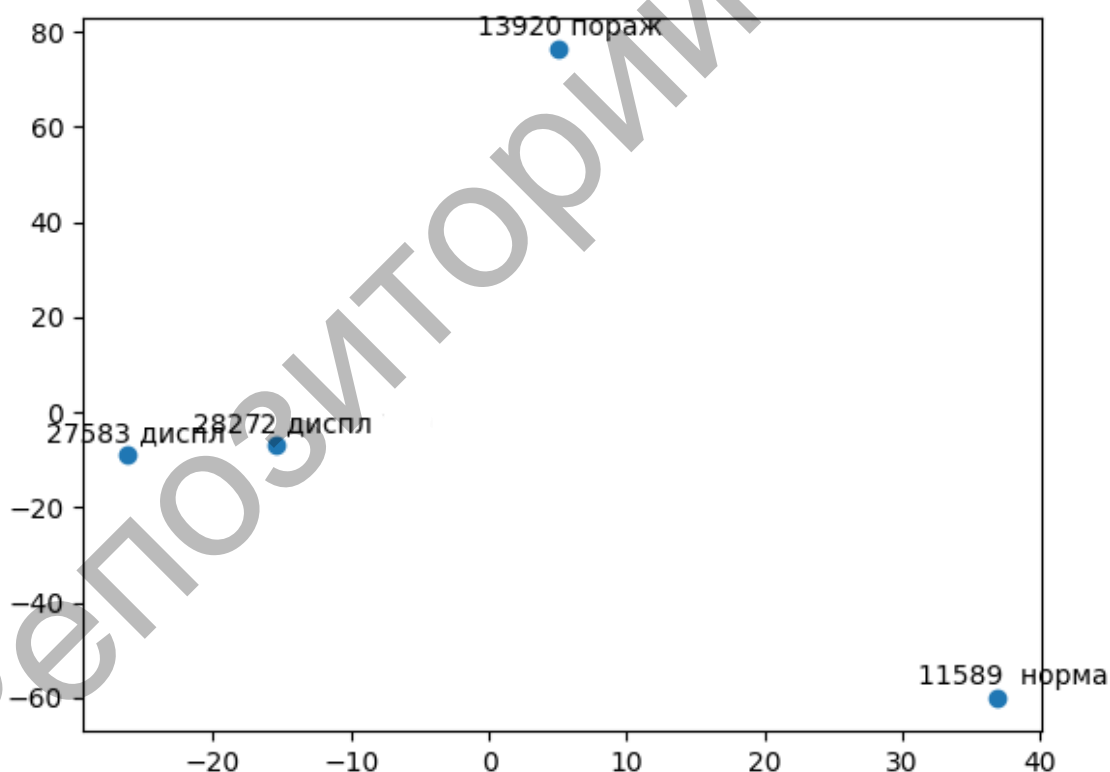


Рисунок 2. – Карта сходства образцов 13920, 27583, 28272, 11589
(для увеличения объектива $\times 10$)

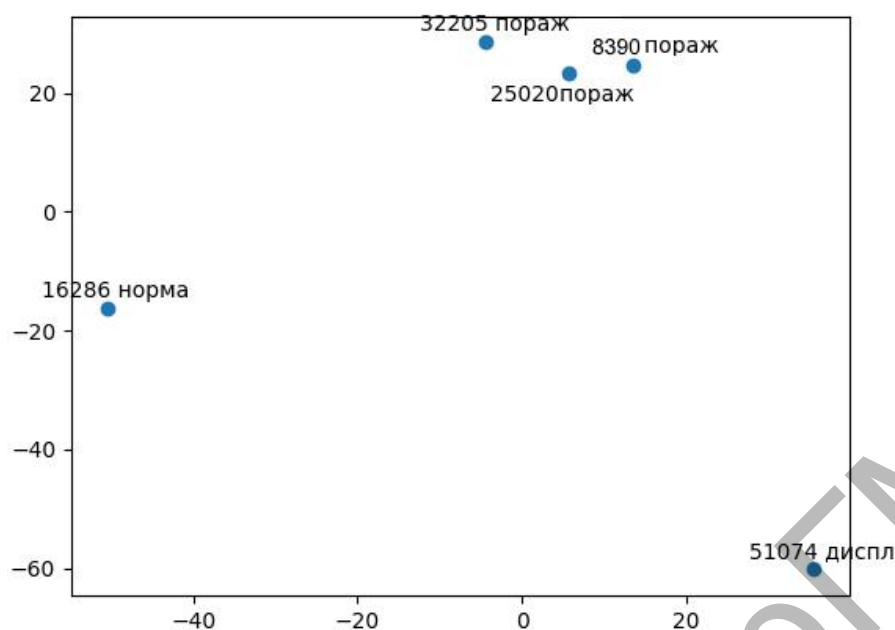


Рисунок 3 – Карта сходства образцов 8390, 25020, 32205, 51074, 16286
(для увеличения объектива $\times 40$)

Из карт сходства видно, что между образцами с одинаковыми патогистологическими заключениями расстояния меньше (образцы группируются рядом), а то время как между образцами с разными диагнозами расстояния намного больше, что свидетельствует о том, что спектральная информация может использоваться как вспомогательная при дифференциальной диагностике.

Выводы. Информация о сканах спектров люминесценции наночастиц CdSe/ZnS в гистологических препаратах позволяет потенциально рассматривать препараты на основе этих частиц как потенциально новые люминесцентные гистологические красители, определяющие локальный pH.

Работа выполнена в рамках ГПНИ «Конвергенция-2025»

Список литературы:

1. Флуоресцентные наночастицы CdSe/ZnS как нанозонды локального pH в диагностике онкологических заболеваний / И. Г. Мотевич, Н. Д. Стрекаль, А. В. Шульга, С. А. Маскевич // Оптика и спектроскопия. – 2018. – Т. 124, № 5. – С. 605-611.
2. Копыцкий, А. В. Определение распределения pH гистологического среза, выдержанного в водном растворе квантовых точек CdSe/ZnS, по их спектрам люминесценции / А. В. Копыцкий, В. Н. Хильманович // Медицинский университет: современные взгляды и новые подходы : Сборник материалов республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 65-летию Гродненского государственного медицинского университета (Гродненский государственный медицинский университет Гродно, 28–29 сентября 2023 г). / Гродненский государственный медицинский университет. – 2023. – С. 243-244.