

# FÉLVEZETŐ BIOMARKEREK VIZSGÁLATA ELSŐ ELVŰ SZÁMÍTÁSOKKAL

Somogyi Bálint

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Atomfizika Tanszék

Gali Ádám

Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Atomfizika Tanszék  
MTA Wigner Fizikai Kutatóközpont, Szilárdtest-fizikai és Optikai Intézet

Az élő szervezetekben lejátszódó alapvető biológiai folyamatok természetének megértéséhez gyakran molekuláris szinten kell tanulmányoznunk azokat. Számos halálos vagy gyógyíthatatlan betegség hozható összefüggésbe rossz térszerkezetű fehérjékkel. Nagyon nagy jelentősége lenne, ha meg tudnánk érteni e betegségek fejlődését, és így információt nyernénk a gyógyítás lehetséges módjával kapcsolatban. E cél eléréseért meg kell határoznunk a különböző molekulák, fehérjék pozícióját a szervezetben.

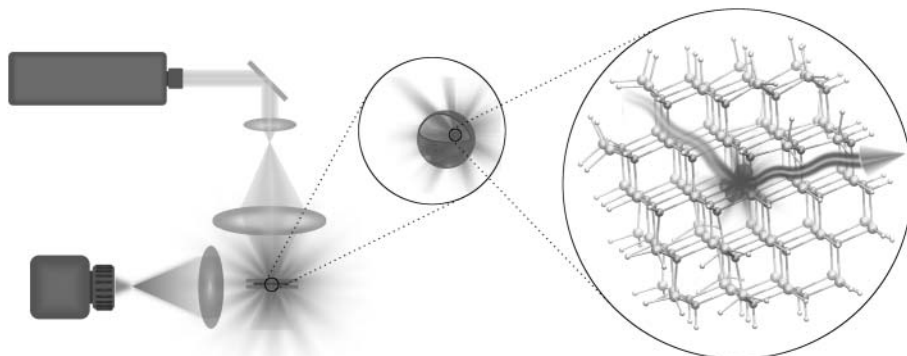
A molekulák detektálásának egyik, régebb óta nagy sikerrel alkalmazott módja a fluoreszcens mikroszkópia. A fluoreszcens mikroszkópia során a vizsgálni kívánt biológiai folyamatban fontos szerepet betöltő fehérjéhez egy – pár nanométeres átmérőjű – fluoreszcens részecskét (biomarkert) kapcsolnak kémiai úton. A fluoreszcens biomarkerek fényvel gerjeszthetők, és a gerjesztett állapotukból egy foton kibocsátásával relaxálódnak. Az emittált foton hullámhossza az adott biomarkerre jellemző, így a kibocsátott fény hullámhossz-specifikus detektálásával a biomarkerek és a hozzájuk kapcsolt molekulák helyzete meghatározható (1. ábra). Ha biomarker sokáig képes megőrizni kedvező optikai tulajdonságait, akkor a fluoreszcens detektálás megismételhető, és a vizsgálni kívánt molekula nyomon követhető.

A fluoreszcens biomarkereket két csoportba oszthatjuk felhasználásuk módjának szempontjából: laboratóriumi körülmények között, szövetmintákban (*in vitro*) és élő, emberi szervezetben (*in vivo*) is használhatjuk őket. Az *in vitro* módon felhasználni kívánt biomarkereknek jellemzően kevésbé szigorú követelményeknek kell megfelelniük, hiszen laboratóriumi körülmények között nagyon kis fényintenzitások detektálása sem okoz problémát, és a biomarker esetleges toxikussága sem jelent problémát, ameddig nincs közvetlen be-

folyással a vizsgálni kívánt folyamatra. Az *in vitro* fluoreszcens vizsgálati módszerek már széles körben elterjedtek, viszont az *in vivo* körülmények között is alkalmazható biomarkerek fejlesztése még mindig egy gyorsan fejlődő, fontos területe a nanotechnológiának. Egy *in vivo* területen felhasználni kívánt ideális biomarkerek a következő jellemzőkkel kell rendelkeznie: (i) Legyen biokompatibilis, tehát ne befolyásolja a vizsgálni kívánt biológiai folyamatot, és ne legyenek káros mellékhatásai. (ii) A hidrodinamikai átmérője legyen elegendően kicsi, hogy a szervezet ki tudja választani, így gyorsan ki tudjon ürülni a szervezetből. A kritikus átmérő körülbelül 5,5 nm. (iii) Oldódjon jól vízben. (iv) Legyen könnyen gerjeszthető, emissziós spektruma pedig legyen éles, nagy intenzitású. Az emissziós hullámhossz essen a közeli infravörös (Near Infrared – NIR) tartományba. Ezt a hullámhossz-intervallumot (700–1300 nm) gyakran közeli infravörös ablaknak nevezik, mivel itt az emberi test abszorpciója minimális. Előnyös, ha az egész intervallumot lefedő biomarkerek rendelkezésre állnak, hiszen a különböző emberi szövetek abszorpciója, szórása és saját fluoreszcens hullámhossza eltérő, valamint előnyös lehet egyszerre több hullámhosszon emittáló biomarkerek alkalmazása. (v) Fontos a kémiai és fotostabilitás.

Az első fluoreszcens biomarkerek szerves makromolekulák voltak. A fluoreszcens szerves molekulák talán legismertebb képviselője a zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein – GFP), amit először medúzából sikerült izolálni. A GFP felfedezéséért Martin Chalfie, Osamu Shimomura és Roger Y. Tsien kémiai Nobel-díjat kapott 2008-ban. Azóta sok, ennél

1. ábra. A fluoreszcencia jelenségét kihasználó molekuláris szintű nyomkövetés sematikus ábrája. A vizsgálni kívánt szövetmintát (*in vivo* esetben élőlényt) megvilágítva a kibocsátott fényt frekvenciaszelektíven detektáljuk. A detektált fény forrása a sejtekbe juttatott fluoreszcens biomarker.



A 2013. évi Magyar Fizikus Vándorgyűlésen elhangzott előadás írott változata.

Az írásban közölt eredmények elérésében komoly érdemei vannak Vörös Mártonnak, Demjén Tamásnak és Szilvási Tibornak.

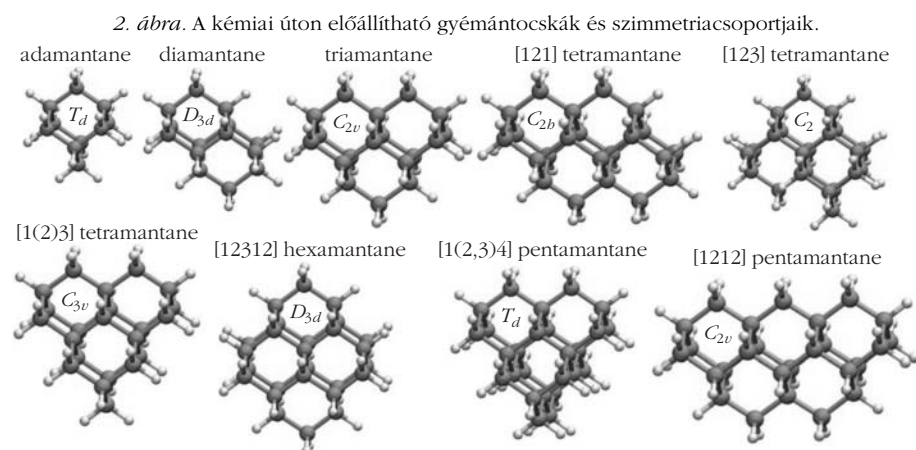
Kutatásainkat az EU FP7 program keretében a DIAMANT, a K101819 és K106114 OTKA projektek, valamint az MTA Lendület program támogatták.

kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkező szerves festékmolekulát is felhasználtak már biomarker alkalmazások megvalósítására, a FITC (fluorescein isothiocyanate) és az IgG (Immunoglobulin G) két tipikus példa. A hagyományos szerves és fehérje alapú fluoreszcens molekulák ugyanakkor számos kedvezőtlen tulajdonsággal is rendelkeznek: nagy intenzitás kell a gerjesztésükhöz, fluoreszcens intenzitásuk általában gyenge, kémiai szerkezetük fény hatására könnyen megváltozik, így gyorsan elveszítik fluoreszcens tulajdonságukat. Sok szerves fluoreszcensről kiderült, hogy enyhén vagy erősebben toxikusak. Ezen hátrányos jellemzők miatt a tudományos érdeklődés egyre inkább a szerves felvezető nanokristályok felé fordult. Többféle típusú szerves felvezető anyagból sikerült fluoreszcens kvantumpöttyöket (quantum dot – QD) előállítani [2], a legfontosabbak ezek közül a CdSe, ZnS, CdTe, InP, InAs, PbS és a PbSe. Ezeket a kvantumpöttyöket széles abszorpciós spektrum jellemzi, fluoreszcens spektrumuk éles, az emittált fotonok hullámhossza pedig kvantumpöttyök méretével hangolható. A kvantumpöttyök további nagy előnye a szerves biomarkerekhez képest, hogy kémiai és fizikai hatásokkal szemben ellenállóbbak, fluoreszcens képességük nagy intenzitású megvilágítás esetén sem csökken, tehát optikai tulajdonságaik és stabilitásuk alapján jelentős előrelépésnek tekinthetők a szerves fluoreszcens molekulákhoz képest [2]. Azonban a szerves kvantumpöttyök sem tekinthetők ideálisnak az *in vivo* biomarker-alkalmazások szempontjából. A fluoreszcens hullámhossz a kvantumpöttyök átmérőjének függvénye, a felsorolt vegyületek közül csak az InP, InAs, PbS és PbSe kvantumpöttyök emittálnak az NIR tartományban [2], ha átmérőjüket a kritikus 5,5 nm-es határnál kisebbre választjuk. Ezek a szerves nanokristályok nem oldódnak vízben, ezért felületüket speciális módon kezelni kell. Az oldhatóság elérése érdekében szerves molekulákat kapcsolnak a nanokristályok felszínéhez, ennek következményeként azonban a hidrodinamikai átmérőjük megnő. A kvantumpöttyök egy másik kedvezőtlen tulajdonsága, hogy gyakran villognak – azaz fluoreszcens intenzitásuk ingadozik az idő függvényében –, elrontva ezzel a fluoreszcens képalkotás minőségét. A felsorolt

félvezető vegyületekből felépülő nanokristályok utolsó, talán legjelentősebb kedvezőtlen tulajdonsága, hogy mindegyikük tartalmaz valamilyen erősen toxikus elemet, a kadmium, indium, arzén és ólom szervezetbe kerülését mindenképpen el kell kerülni. A mérgező elemekből felépülő nanokristályok toxicitásáról jelenleg keveset tudunk, így ez napjainkban még erősen kutatás alatt álló téma. Több cikk jelent meg, amely mérgező ionok kiválásáról számol be, de vannak olyan tanulmányok is, amelyek szerint a nanokristályok biológiailag inerteek, annak ellenére, hogy mérgező elemekből épülnek fel. Általánosan elfogadott nézet, hogy egy adott vegyületből felépülő nanokristály toxicitását is nagyon sok tényező befolyásolja, többek között mérete, töltése, fotostabilitása, oxidációs hajlama és környezetének kémiai összetétele is. A nanokristályok biokompatibilitásának vizsgálata és javítása fontos kutatási irány a nanotechnológiában. A nanokristályok toxicitásának csökkentésére gyakori megoldás, hogy felületükre biokompatibilis (vagy kevésbé toxikus) réteget növesztenek, de ez szintén nagyobb hidrodinamikai átmérőt (jellemzően > 10 nm) eredményez.

#### IV. főcsoportba tartozó félvezető biomarkerek

Kutatásunk során szilíciumkarbid (SiC) és gyémánt nanokristályokkal kapcsolatban végeztünk vizsgálatokat. A SiC az utóbbi időben nagy figyelmet szerzett, mint ígéretes biokompatibilis anyag, porózus SiC-ot használnak például mesterségescsont-implantátumokban. Nem túl régen derült ki, hogy köbös szerkezetű 3C-SiC nanokristályok állíthatók elő porózus 3C-SiC felhasználásával. Az így előállított nanokristályok mérete 6 nm-től egészen az 1 nm-es átmérőnél is kisebb tartományig oszlott el. A SiC nanokristályok esetében a fluoreszcencia hullámhossza a nanokristály méretének és a felületen létrejövő kémia kötéseinek is függvénye, az eddig előállított SiC nanokristályok esetében a 450–550 nm-es tartományba esik az emissziós spektrum csúcsa. Ugyan a tömbi SiC bioinert anyagnak tekinthető, azonban a SiC nanokristályok biokompatibilitása még nem teljesen tisztázott, de az eddigi kutatások eredményei biztatóak. Figyelembe véve, hogy a



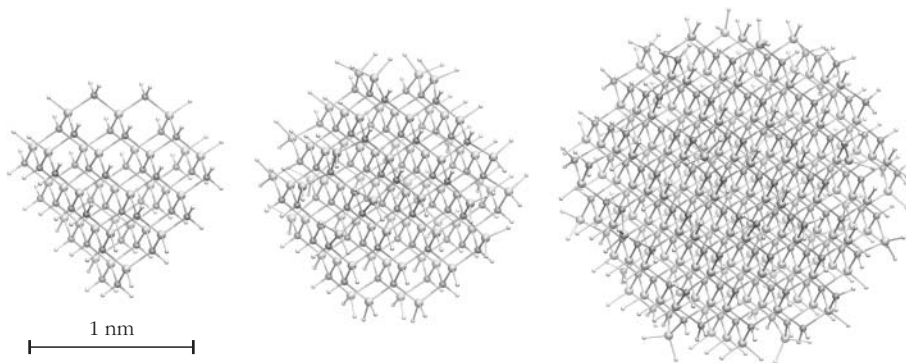
SiC nanokristályok kis méretűek és vízben jól oldódnak, elmondhatjuk, hogy kifejezetten ígéretes biomarkerjelöltek. Fluoreszcens spektrumuk viszont nem felel meg az *in vivo* alkalmazások követelményeinek. Az emittált fény hullámhosszát elegendő mértékben megnövelve (NIR tartomány) közel ideális tulajdonságokkal rendelkező fluoreszcens biomarkereket hozhatnánk létre. A nanokristályok felületének kémiai kezelésével az emittált fény hullámhossza hangolható.

tó, a [4] hivatkozásban arról számolnak be, hogy a felületen kialakuló Si=O és C=O kettős kötések jelentős hatással vannak a nanokristály optikai tulajdonságaira, és a nagyobb hullámhosszak irányába tolják el az abszorpció és emissziós spektrumot. Egy másik lehetőség a közeli infravörös emissziós spektrum elérésére, ha színcentrumokat hozunk létre a nanokristályokban. Tömbi szilíciumkarbidban számos, az infravörös ablakban emittáló ponthiba ismert, mint például a szilícium-vakancia, -divakancia, illetve különböző átmeneti fémekhez kapcsolható ponthibák. Kutatásunk során megvizsgáltuk ezen ponthibák hatását az 1-2 nm átmérőjű SiC nanokristályok fluoreszcens tulajdonságaira. A szilícium-vakancia és -divakancia mellett vanádium-, molibdén- és volfrámszennyezőkkel végeztünk számításokat. A fém-szennyezők esetében kétféle ponthibát vizsgáltunk: a) a szennyező atom egy szilíciumatom helyére épül be (szubsztitúciós hiba), b) a szilíciumatom helyére beépülő fématom mellett egy szén-vakancia van (szubsztitúciós hibavakancia-komplex). Korábbi eredményeink alapján az intersticiális, illetve szén-szubsztitúciós hibák energetikailag kedvezőtlenek, ezért kialakulásuk valószínűtlen.

A legkisebb nanogyémántok 10-26 szénatomból épülnek fel (2. ábra), felületükön lévő lógó kötések hidrogénatomokkal passziváltak, és kőolajból nagy tisztasággal előállíthatók. Mivel kémiai szerkezetük pontosan ismert, ezért alkalmasak különböző első elvű módszerek pontosságának tesztelésére. Korábbi számításaink megmutatták, hogy az időfüggő sűrűségfüggő elmélettel a nanogyémántok optikai tiltott sávja nagy pontossággal meghatározható [6]. Rendkívül kis méretük, biokompatibilitásuk és fotostabilitásuk ellenére az ultraibolya fluoreszcens emissziójuk meggátolja az *in vivo* körülmények között történő felhasználásukat a biológiai érzékelésben. Mivel a felület/térfogat arányuk nagy, ezért fizikai tulajdonságaik a felületi kémiai kötések megváltoztatásával drasztikusan befolyásolhatók. Kutatásunk során megvizsgáltuk, hogy a megfelelő hidrogénatomok kénatomokra cserélésével hogyan változik meg a nanogyémántok fluoreszcens hullámhossza.

## Eredmények

A nanostruktúrák elektronszerkezetének meghatározására a sűrűségfüggő elméleten alapuló módszerek a legalkalmasabbak, mivel megbízhatóak, viszonylag jó eredményeket adnak, és – a többi elektronszerkezet-számítási módszerhez képest – a számítási idő kedvezően skálázódik a rendszer méretével. A nanoszerkezetek geometriáját a hagyományos sűrű-

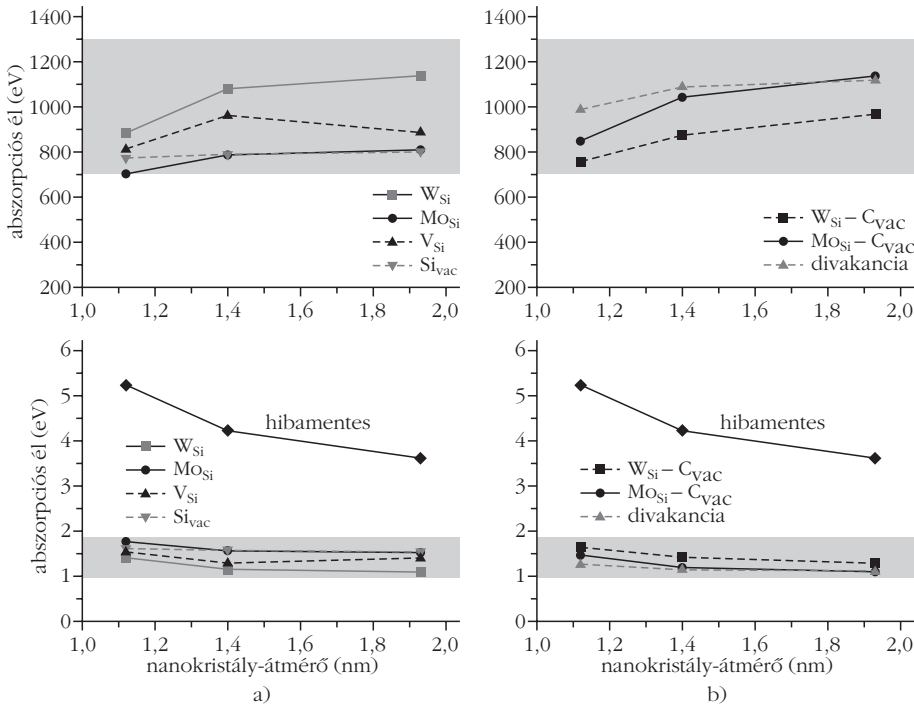


3. ábra. A három különböző méretű SiC modell-nanokristály.

ségfüggő elmélet segítségével, abszorpció spektrumukat pedig időfüggő sűrűségfüggő elmélet segítségével határoztuk meg [1].

## Szilíciumkarbid nanokristályok

A szimulációkat körülbelül 1-2 nm átmérőjű, göbbszimmetrikus SiC nanokristályokkal végeztük. Ekkora SiC nanokristályok már kísérletileg is előállíthatók, a TEM vizsgálatok alapján pedig az előállított nanokristályok jó közelítéssel göbbszerűnek tekinthetők. A nanokristályok felületén a lógó kötések hidrogénatomokkal semlegesítettük. Három különböző méretű modell-nanokristályt vizsgáltunk:  $\text{Si}_{31}\text{C}_{41}$  ( $d = 1,1$  nm),  $\text{Si}_{79}\text{C}_{68}$  ( $d = 1,4$  nm) és  $\text{Si}_{177}\text{C}_{176}$  ( $d = 2,0$  nm), lásd a 3. ábrát. A különböző ponthibákat a különböző méretű nanokristályok közepébe helyezve megvizsgáltuk az optikai gap (azaz a legalacsonyabb optikailag aktív gerjesztés energiájának) változását. Az alkalmazások szempontjából az emissziós hullámhossz a fontosabb, de ennek közvetlen számítása nagyon nehéz feladat, ezért az abszorpció tulajdonságokból következtettünk az emisszióra. A számítások eredményei az 4. ábrán láthatók. Megállapítható, hogy a szilícium-vakancia, -divakancia, illetve a vizsgált fém szennyezőkhöz kapcsolódó ponthibák drasztikus hatással vannak a nanokristályok optikai tulajdonságaira. A színcentrumokat tartalmazó nanokristályok abszorpció éle a közeli infravörös tartományba esik, míg a hibamentes nanokristályok az ultraibolya tartományban emittáltak eredetileg. Mivel a számított gerjesztési energiák a nanokristályok abszorpció tulajdonságait jellemzik, ezért meghatároztuk a Stokes-eltolódás – amely az abszorpció és emisszió energia különbsége – értékét is néhány jellegzetes esetben. Figyelembe véve, hogy számításaink alapján a Stokes-eltolódás értéke jellemzően 0,1-0,2 eV, megállapítható, hogy a nanokristályok optikai gapjére kapott értékek jól közelítik a várható fluoreszcens emisszió energiát. Az optikai gap nagy mértékű csökkenését a következőképpen magyarázhatjuk: a ponthiba két mély hibanívót hoz létre a nanokristály tiltott sávjában, ezek között történik az optikai átmenet. A gerjesztett állapotban kialakuló elektron és lyuk a ponthibára lokalizált, így a köztük fellépő Coulomb-kölcsönhatás igen erős (~1-2 eV), ami a gerjesztési energia további csökkenéséhez vezet.



4. ábra. A számított eredmények az abszorpciós él értékére eV, illetve nm egységekben. A szürke csíkok a biológiai alkalmazások szempontjából kedvező közeli infravörös tartományt jelölik. Látható, hogy a ponthibák hatására az abszorpciós él értéke jelentősen lecsökken. A bal oldali ábrákon a szilícium-vakancia és a szilíciumatom helyére beépülő fématomok hatása látható. A jobb oldali ábrákon a divakancia, illetve a szén-vakancia melletti szilíciumatom helyére beépülő fématomok hatását ábrázoltuk.

### Gyémánt nanokristályok

Két különböző nanogyémánt esetében vizsgáltuk meg a felületi kénatomok hatását az abszorpcióra. Az adamantane a legkisebb, a pentamantane pedig az egyik legnagyobb kémiai szintetizálható gyémánt nanokristály. A nanogyémántok felületén némelyik szénatomhoz két hidrogénatom kapcsolódik, amelyeket kénatomra cserélve kettős kötés alakul ki a szén- és kénatom között. Már kísérletileg is sikerült olyan adamantantet előállítani, ahol kettős, illetve négy hidrogénatomot cseréltek ki egy, illetve kettős kénatomra.

Először azt vizsgáltuk meg, hogy mi történik az adamantane alacsony energiás gerjesztéseivel, ha két hidrogént cserélünk ki egy kénatomra, mivel ebben az esetben a kísérleti abszorpciós spektrum ismert.

A számítás eredménye jó összhangban állt az abszorpciós élre kísérletileg kapott 5,3 eV-os értékkel. Megállapítottuk, hogy a kénatom eny-

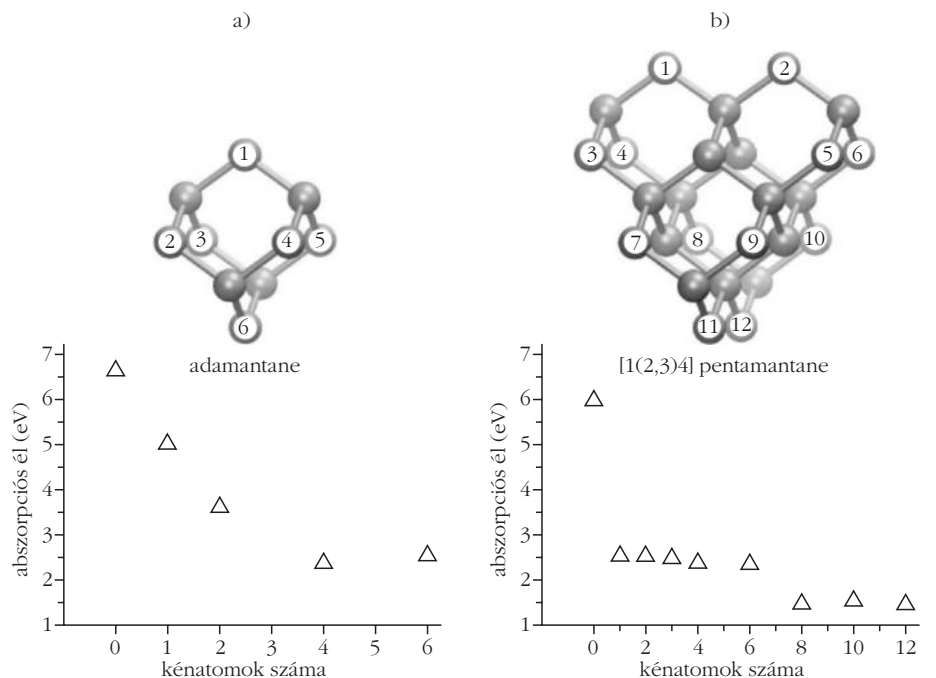
hén pozitívan, míg a szénatom enyhén negatívan polarizált. Ezek után több C=S kötést hoztunk létre az adamantane felületén, ügyelve arra, hogy a kénatomok a lehető legtávolabb legyenek egymástól (ezzel biztosítva az energetikailag kedvező elrendezést az egymást taszító polarizált kénatomok számára). Az 5.a ábrán látható, hogy egyre több C=S kötés hatására az abszorpciós él értéke egyre csökken, és végül már a látható tartományba esik.

Megállapítottuk, hogy az optikai gap csökkenésének oka a szén- és kénatomok közötti egyre nagyobb töltéstranszfer, amit pedig az egymáshoz közel kerülő kénatomok közötti szterikus erők okoznak.

A nagyobb, összesen 26 szénatomból felépülő pentamantane esetében is megvizsgáltuk a C=S kettős kötések hatását az abszorpciós élre.

Az eredmények az 5.b ábrán láthatók. A számítások alapján már egyetlen C=S kötés is 2,6 eV-ra csökkenti az optikai gapot, nyolc felületi kénatom esetén pedig a közeli infravörös tartományba esik a legalacsonyabb gerjesztés energiája.

5. ábra. A legkisebb gerjesztési energia a C=S kötések számának függvényében: a) adamantane b) pentamantane esetében. Az abszorpciós él drasztikusan lecsökken a felület szulfurizációjának hatására.



## Összefoglalás

Kutatásunk során atomi szintű számítógépes szimulációkkal vizsgáltuk gyémánt és szilíciumkarbid nanokristályok tulajdonságait *in vivo* biomarker alkalmazások szempontjából. Megállapítottuk, hogy megfelelő ponthibák létrehozásával a szilíciumkarbid nanokristályok optikai tulajdonságai nagy mértékben hangolhatók, az eredményeinket a [3] cikkben publikáltuk. Megmutattuk, hogy a legkisebb gyémánt nanokristályok abszorpciós éle is a közeli infravörös tartományba kerül bizonyos, a felületen lévő kémiai kötések hatására. A részletes eredményekről az [5] hivatkozásban lehet olvasni. Az általunk vizsgált nanokristályok nem mérgezőek, fotostabilak, elegendően kis méretűek, és számításaink alapján fluoreszcens hullámhosszuk a közeli infravörös tartományba esik. A manapság elterjedt szerves és félvezető nanokristály biomarkerekhez képest előnyös tulajdonságokkal rendel-

keznek, így jó alternatívát jelenthetnek a biológiai molekulák képalkotásában.

## Irodalom

1. M. A. L. Marques, N. T. Maitra, F. M. S. Nogueira, E. K. U. Gross, A. Rubio (szerk.): *Fundamentals of Time-Dependent Density Functional Theory*. Springer, 2012.
2. X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss: Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science* 307/5709 (2005) 538–544.
3. B. Somogyi, V. Zólyomi, A. Gali: Near-infrared luminescent cubic silicon carbide nanocrystals for in vivo biomarker applications: an ab initio study. *Nanoscale* 4 (2012) 7720–7726.
4. M. Vörös, P. Deák, T. Frauenheim, A. Gali: The absorption of oxygenated silicon carbide nanoparticles. *The Journal of Chemical Physics* 133/6 (2010) 064705.
5. M. Vörös, T. Demjén, T. Szilvási, A. Gali: Tuning the optical gap of nanometer-size diamond cages by sulfurization: A time-dependent density functional study. *Phys. Rev. Lett.* 108 (2012) 267401.
6. M. Vörös, A. Gali: Optical absorption of diamond nanocrystals from *ab initio* density-functional calculations. *Phys. Rev. B* 80 (2009) 161411.