

УДК 616.073

## ДИЗАЙН ОПТИЧЕСКИ КОДИРОВАННЫХ МИКРОСФЕР РАЗЛИЧНЫХ ДИАМЕТРОВ ДЛЯ МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

© 2025 г. М. Д. Соколов<sup>а, \*</sup>, Е. С. Герасимович<sup>а</sup>, И. Р. Набиев<sup>а, б</sup>, А. В. Суханова<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, 115409 Россия

<sup>б</sup>Университет Реймса Шампань-Арденны, Реймс, 51100 Франция

\*E-mail: msokolov1910@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2024 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 18.06.2024 г.

Разработка инновационных методов флуоресцентной детекции на основе оптически кодированных микросфер разных цветов и размеров является актуальным направлением многопараметрической детекции и диагностики широкого круга заболеваний. Так, технология xMAP американской компании Luminex основана на использовании полистироловых микросфер, окрашенных двумя или тремя органическими флуорофорами в различных соотношениях, каждая из которых обладает уникальными спектральными характеристиками. Несмотря на способность детектировать до 80 белков или последовательностей ДНК в одной тестовой системе, необходимость использования специального оборудования только этой компании для мультиплексного анализа и характерные недостатки органических флуорофоров (большой Стоксовый сдвиг, фотовыцветание при лазерном возбуждении) ограничивают применения этой технологии. Целями настоящего исследования были дизайн и создание микросфер, кодированных полупроволниковыми квантовыми точками. Карбоксилированные меламина-формальдегидные микросферы двух размеров были оптически кодированы квантовыми точками двух цветов, иммобилизованных на поверхности микросфер методом послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов. В результате были получены шесть популяций микросфер, имеющих разные размеры и/или уникальные оптические коды, обладающие стабильностью и гомогенностью в водных растворах в течение длительного времени. Анализ полученных микросфер методами динамического светорассеяния, эпифлуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии показал их пригодность для многопараметрического анализа. При этом, использование для оптического кодирования квантовых точек позволило исключить фотодеграцию сигнала и обеспечило возможность возбуждения всех популяций одной и той же длиной волны излучения при эффективном разделении сигналов от микросфер в разных каналах стандартного проточного цитометра.

**Ключевые слова:** микросферы, квантовые точки, флуоресценция, многопараметрический анализ, проточная цитометрия, диагностика

**DOI:** 10.56304/S2079562925010233

### ВВЕДЕНИЕ

Современные биомедицинские исследования остро нуждаются в высокопроизводительных и высокочувствительных технологиях детекции, что становится возможным благодаря разработке многопараметрических систем с расширенным диапазоном определяемых концентраций, позволяющих одновременно и с высокой скоростью и точно измерять количественное содержание сразу нескольких аналитов [1, 2]. Технологии молекулярной диагностики, использующие оптически-кодированные флуоресцентными красителями (флюо-

рофорами) микросферы, представляют особый интерес для многопараметрического биоанализа благодаря простоте их использования и широкого присутствия считывающего оптические сигналы оборудования в клинической практике (микроскопы, ридеры, проточные цитометры) [2].

Компании Luminex и BD Biosciences разработали мультиплексные системы на основе микросфер, оптически кодированных классическими органическими красителями [3]. На поверхности микросфер каждого типа расположены распознающие молекулы, специфически взаимодействующие

ющие с исследуемыми маркерами (аналитами), а использование адаптированного к прочтению сигналов xMAP микросфер проточного цитометра Luminex позволяет считывать спектральный адрес конкретной микросферы и сигнал репортерного флуорофора, интенсивность которого зависит от количества связавшегося аналита [4, 5]. Несмотря на способность детектировать до 80 белков или последовательностей ДНК в одной тестовой системе, необходимость использования специального оборудования только этой компании для мультиплексного анализа и характерные недостатки органических флуорофоров (большой Стоксовый сдвиг, фотовыцветание при лазерном возбуждении) ограничивают применения этой технологии. Действительно, спектральные свойства органических красителей требуют специального оборудования с несколькими возбуждающими лазерами для считывания оптического кода, что делает анализ трудоемким и дорогостоящим. Эти проблемы могут быть решены при использовании для оптического кодирования полупроводниковых квантовых точек (КТ), отличающихся высокими квантовым выходом, отсутствием фотодегradации при возбуждении лазерным облучением и квазинепрерывным спектром поглощения, что обеспечивает возможности возбуждения флуоресценции квантовых точек разных цветов излучением одной и той же длины волны [6–15]. Уникальные оптические свойства КТ делают их идеальными кандидатами для многопараметрического анализа с использованием стандартных проточных цитометров – КТ могут быть возбуждены с помощью одного источника излучения, при этом их пики флуоресценции могут быть эффективно разделены и обнаружены в разных каналах проточного цитометра [7]. Таким образом, многопараметрический анализ с помощью проточной цитометрии с использованием микросфер, кодированных КТ, прост в выполнении и не требует специального оборудования.

В представленном исследовании нами было получено шесть популяций меламина-формальдегидных микросфер различного размера, кодированных квантовыми точками разного цвета (КТ-534, КТ-593) с различными уровнями интенсивности свечения. Для получения оптически кодированных микросфер использовали метод послойного попеременного нанесения слоев противоположно заряженных полиэлектролитов и отрицательно заряженных квантовых точек на поверхность меламина-формальдегидных микросфер.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использовали карбоксилированные меламина-формальдегидные микросферы с диаметром 4.02, 6.1 и 8.24 мкм (Microparticles, GmbH). Стабильные водорастворимые КТ, состоящие из ядра селенида кадмия (CdSe) и покрытые оболочкой из сульфида цинка (ZnS), имеющие максимумы флуоресценции при 534 и 593 нм, были получены с помощью двухстадийной процедуры замещения органической оболочки триоктанфосфина (ТОРО) на DL-цистеин и последующего замещения цистеиновой оболочки низкомолекулярным производным полиэтиленгликоля, содержащим тиольные (–SH) и карбоксильные группы (–COOH) [1]. Концентрацию полученных КТ определяли спектрофотометрически, с использованием спектрофотометра Cary 60, Agilent Technologies. Принцип оптического кодирования микросфер заключался в создании структуры многослойной полимерной оболочки на поверхности карбоксилированных меламина-формальдегидных ядер, с включением водорастворимых КТ в состав этой полимерной оболочки. Для получения полимерной оболочки использовали метод послойного нанесения противоположно заряженных полиэлектролитов: поли(аллиламин гидрохлорида) (ПАГ) с  $M_w \approx 65000$  Да и поли(натрий 4-стиролсульфоната) (ПСС) с  $M_w \approx 70000$  Да, по описанной ранее процедуре [15]. Размер и заряд поверхности полученных водорастворимых КТ, а также оптически кодированных микросфер на каждом этапе нанесения нового слоя полимера, измеряли с помощью анализатора динамического светорассеяния и  $\zeta$ -потенциала частиц (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). Оптические свойства кодированных микросфер различного диаметра были исследованы с помощью эпифлуоресцентной микроскопии (Nikon Eclipse TE2000-S). Анализ микросфер кодированных КТ проводили с помощью проточного цитометра (FACSCantoII, Becton Dickinson). Возбуждение флуоресценции КТ, определяющих оптический код популяций микросфер, проводили с использованием аргонового лазера с длиной волны излучения 488 нм. Интенсивность флуоресценции определяли в двух стандартных каналах проточного цитометра: FITC (530/30 нм), PE (575/25 нм).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе были получены стабильные в водном растворе модифицированные полимером (SH)–ПЭГ–COOH водорастворимые КТ-534 и КТ-593 (с максимумами флуоресценции 534 и 593 нм), с концентрацией 4.9 и 5.4 мг/мл соответственно. Для этих КТ были определены гидродинамический диаметр и  $\zeta$ -потенциал (табл. 1).

**Таблица 1.** Характеризация размера и поверхностного заряда модифицированных водорастворимых квантовых точек (КТ)

№	Образец	$T, ^\circ\text{C}$	Гидродинамический диаметр, нм*	Стандартное отклонение, $\sigma$	$\zeta$ -потенциал, мВ*	Стандартное отклонение, $\sigma$
1	КТ 534 (SH)-ПЭГ-СООН	25	30.17	0.68	-55.4	1.81
2	КТ 593 (SH)-ПЭГ-СООН	25	29.36	0.21	-37.0	1.77

\* Среднее значение трех независимых измерений.

Для оптического кодирования микросфер был использован метод послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов [1]. Исходные карбоксилированные меламина-формальдегидные микросферы разного диаметра имели отрицательный заряд на поверхности, что способствовало эффективной адсорбции положительно заряженного полимера (ПАГ). Это приводило к изменению заряда поверхности микросфер на положительный, что, в свою очередь, позволяло адсорбировать отрицательно заряженный полимер (ПСС), и так далее, обеспечивая последовательное чередование противоположно заряженных полимеров. Водорастворимые КТ, модифицированные SH-ПЭГ-СООН, имели отрицательный заряд, что способствовало их адсорбции на положительно заряженном полимерном слое ПАГ. В результате по-

слойного нанесения полиэлектролитов и КТ было получено шесть типов микросфер с оболочкой состава  $(\text{ПАГ/ПСС})_2/\text{ПАГ/КТ}/(\text{ПАГ/ПСС})_2$  (рис. 1).

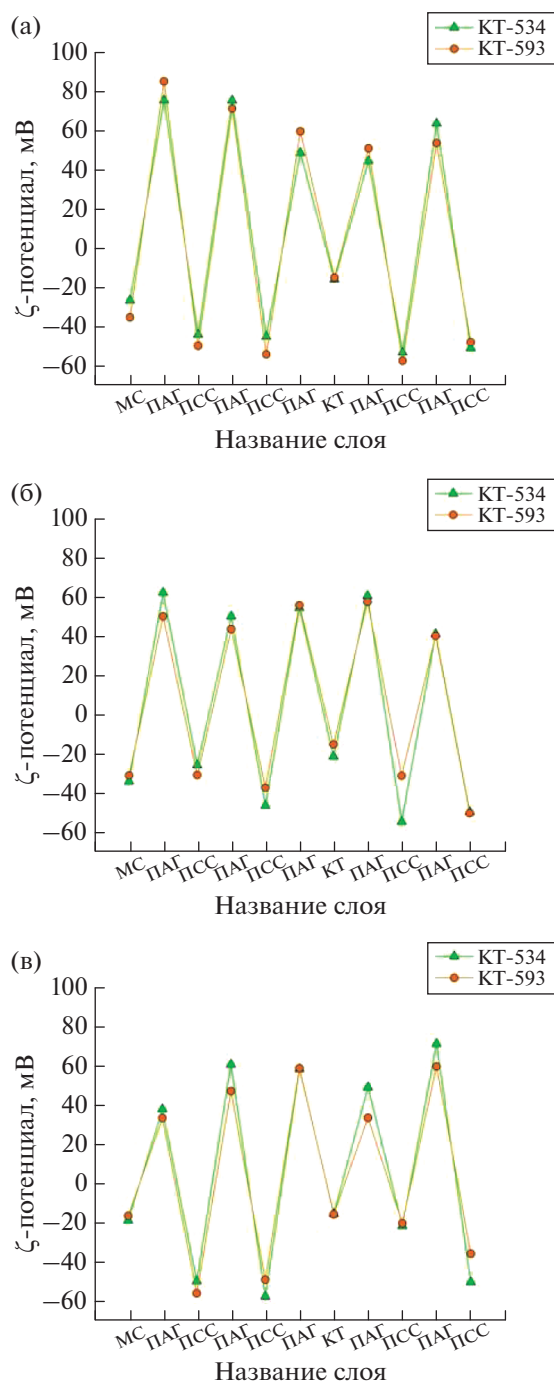
Размер микросфер, кодированных КТ, определяли с помощью анализатора динамического светорассеяния и электрического  $\zeta$ -потенциала (табл. 2).

Оптически кодированные микросферы были изучены с помощью эпифлуоресцентной микроскопии. Изображения были получены с использованием двух оптических фильтров, FITC и PE(CY3), а также объектива  $20\times/0.35$ . Результаты анализа показывают, что полученные микросферы, кодированные КТ, обладают интенсивной флуоресценцией и гомогенностью (рис. 2).

Шесть типов полученных микросфер, кодированных КТ с максимумами флуоресценции 534 и 593 нм, были проанализированы с помощью про-

**Таблица 2.** Характеризация размера микросфер (МС), кодированных квантовыми точками (КТ) КТ-534 и КТ-593

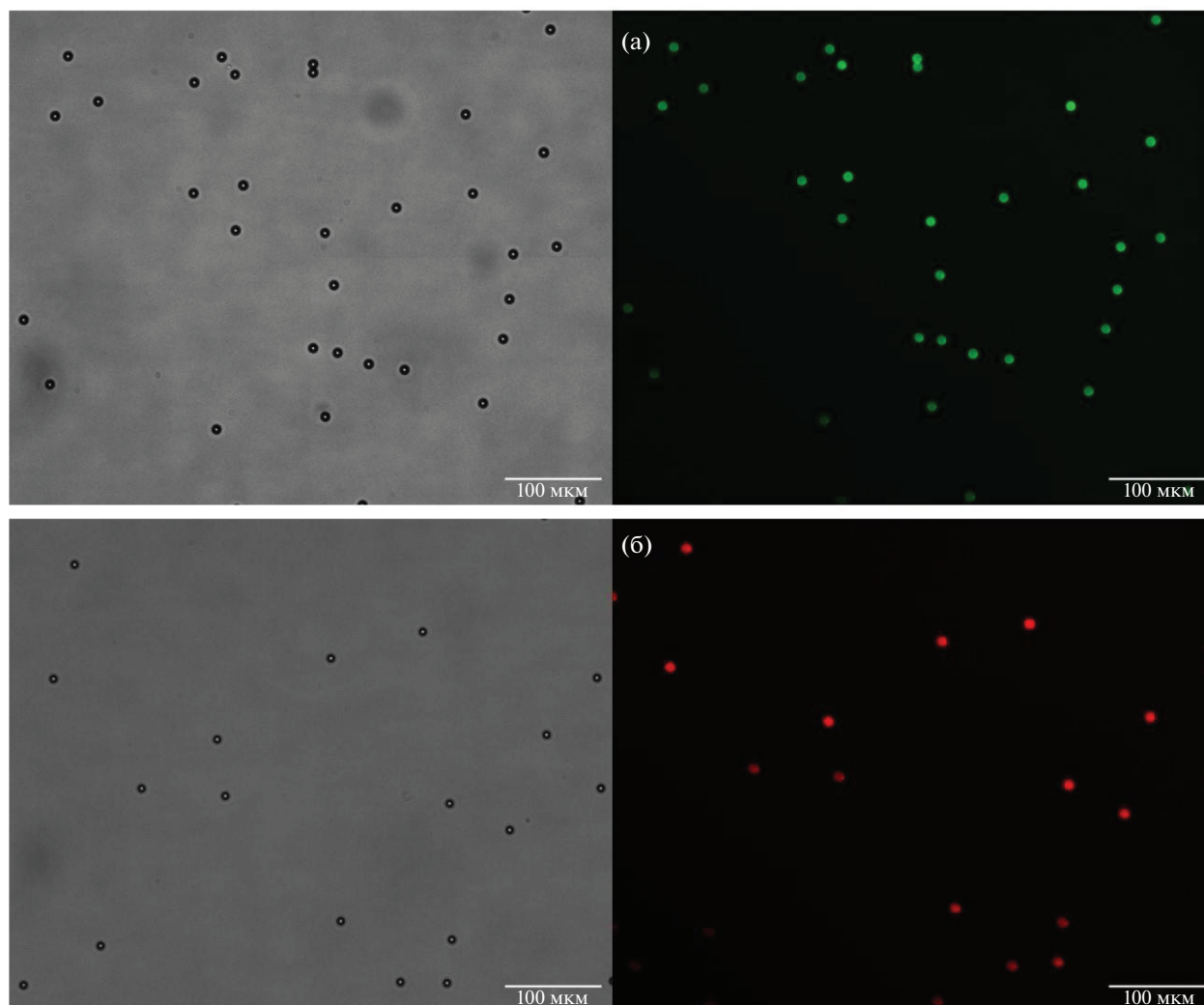
№	Образец	$T, ^\circ\text{C}$	Индекс полидисперсности	Гидродинамический диаметр, мкм
1	МС (4.02 мкм)–534 нм	25	0.268	4.449
2	МС (4.02 мкм)–593 нм	25	0.240	4.453
3	МС (6.10 мкм)–534 нм	25	0.152	6.887
4	МС (6.10 мкм)–593 нм	25	0.298	6.931
5	МС (8.24 мкм)–534 нм	25	0.267	9.128
6	МС (8.24 мкм)–593 нм	25	0.305	8.968



**Рис. 1.** Графики изменения поверхностного заряда при нанесении полиэлектролитов на поверхность меламин-формальдегидных микросфер размером 4.02 (а), 6.1 (б) и 8.24 (в) мкм. КТ – квантовые точки, МС – меламин-формальдегидные микросферы, ПАГ – поли(алиламин гидрохлорид), ПСС – поли(натрий 4-стиролсульфонат).

точной цитометрии. Полученные данные показывают, что расположение популяций на диаграмме прямого и бокового светорассеяния позволяют разделять микросферы по размеру (рис. 3а). Оп-

тические коды популяций детектировали в каналах FITC (для КТ-534) и PE (для КТ-593), что позволяло разделять их по оптическим кодам (рис. 3б). Важно отметить, что полученные попу-



**Рис. 2.** Микросферы различного размера, кодированные квантовыми точками (КТ) различных цветов: (а) микросферы размера 8.97 мкм, кодированные КТ-593; (б) микросферы размера 9.12 мкм, кодированные КТ-534. Слева — изображения, полученные в режиме световой микроскопии; справа — флуоресцентные изображения.

ляции микросфер разного размера и с разными оптическими кодами хорошо дифференцируются при измерении методом проточной цитометрии.

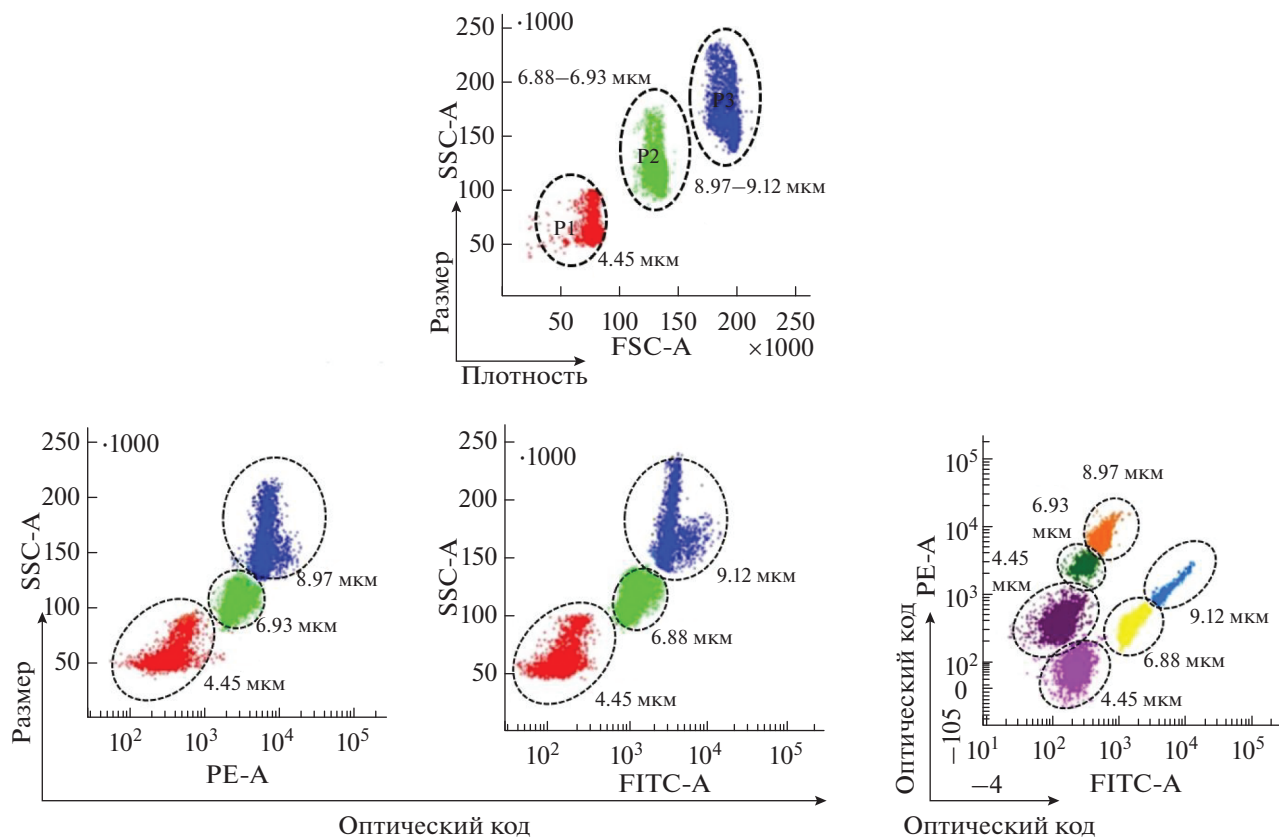
Было показано, что интенсивность флуоресценции микросфер зависит от их размера. Для микросфер диаметром 4.02 мкм интенсивность флуоресценции составляла приблизительно  $10^2$  отн.ед., в то время как для микросфер диаметром 6.1 мкм и 8.24 мкм интенсивность флуоресценции варьировалась в диапазоне от  $10^2$  до  $10^4$  отн. ед.

Результаты цитометрического анализа показывают, что микросферы различного диаметра, кодированные КТ-534 и КТ-593, гомогенны и могут быть идентифицированы по размеру и цвету. Оптически кодированные микросферы успешно раз-

деляются в смеси флуоресцентных микросфер, обеспечивая их точную дифференцировку. Таким образом, полученные микросферы, кодированные КТ, могут послужить основой для создания системы многопараметрического анализа с использованием метода проточной цитометрии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложен дизайн и получены микросферы разных размеров, оптически кодированные квантовыми точками с максимумами флуоресценции 534 и 593 нм, которые характеризуются высокой гомогенностью, стабильностью и интенсивной флуоресценцией, подтвержденные методами динамического светорассеяния



**Рис. 3.** Результаты анализа образцов флуоресцентных микросфер, кодированных квантовыми точками, с помощью проточной цитометрии: (а) дифференцировка микросфер по светорассеянию (размер и плотность частиц); (б) дифференцировка микросфер по оптическому коду. SSC — боковое рассеяние; FSC — прямое рассеяние; FITC — флуоресцеин; PE — фикоэритрин.

и эпифлуоресцентной микроскопии. Оптически кодированные микросферы эффективно разделяются в разных каналах проточного цитометра при возбуждении одно и той же длиной волны лазерного возбуждения при полном отсутствии фотодеградации. Таким образом, метод оптического кодирования полимерных микросфер водорастворимыми КТ с помощью метода послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов обеспечивает получение популяций флуоресцентных микросфер со свойствами, превышающими свойства традиционных систем на основе органических флуорофоров, и пригодны для создания тест-систем многопараметрического анализа с использованием проточной цитометрии на их основе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Huang H.-J. et al. // Front. Immunol. 2021. V. 11. P. 594978.
2. Marques de Figueiredo A. et al. // Exp. Biol. Med. 2022. V. 247. P. 1852.
3. Diasorin, xMAP Technology: The world's most used multiplexing technology. <https://int.diasorin.com/en/luminex-ltg/xmap-technology>.
4. Kleymenov D.A. et al. // Front. Microbiol. 2017. V. 8. P. 2341.
5. Kang J.H. et al. // Methods. 2012. V. 56 (4). P. 484.
6. Brazhnik K. et al. // Nanomedicine. 2015. V. 11 (5). P. 1065.
7. Bilan R. et al. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 1.
8. Han M. et al. // Nat. Biotechnol. 2001. V. 19. P. 631.
9. Wang G. et al. // ACS Nano. 2013. V. 7 (1). P. 471.
10. Song T. et al. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2014. V. 6 (4). P. 2745.
11. Sukhanova A., Nabiev I. // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2008. V. 68 (1). P. 39.
12. Cao Y.C. et al. // Anal. Biochem. 2006. V. 351 (2). P. 193.
13. Fournier-Bidoz S. et al. // Angew. Chem. 2008. V. 47 (30). P. 5577.
14. Berestovoy M.A. et al. // J. Phys. 2017. V. 784. P. 1.
15. Bilan R.S. et al. // Chem. Phys. Chem. 2017. V. 18 (8). P. 970.

## Design of Optically Encoded Microspheres of Different Diameters for Multiparametric Flow Cytometry

M. D. Sokolov<sup>1, \*</sup>, E. S. Gerasimovich<sup>1</sup>, I. R. Nabiev<sup>1, 2</sup>, and A. V. Sukhanova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia

<sup>2</sup> Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, 51100 France

\*e-mail: msokolov1910@gmail.com

Received June 17, 2024; revised June 17, 2024; accepted June 18, 2024

**Abstract**—The development of innovative fluorescence detection methods based on optically encoded microspheres of different colors and sizes is an important direction of multiparameter detection and diagnostics of a wide range of diseases. Thus, the xMAP technology of the American company Luminex is based on the use of polystyrene microspheres colored with two or three organic fluorophores in different ratios, each of which has unique spectral characteristics. Despite the ability to detect up to 80 proteins or DNA sequences in a single test system, the need to use special equipment only from this company for multiplex analysis and the characteristic disadvantages of organic fluorophores (large Stokes shift, photo-bleaching under laser excitation) limit the application of this technology. The objectives of the present study consisted of the design and fabrication of microspheres encoded with semiconducting quantum dots. Carboxylated melamine-formaldehyde microspheres of two sizes were optically encoded with quantum dots of two colors immobilized on the surface of the microspheres by layer-by-layer adsorption of oppositely charged polyelectrolytes. As a result, six populations of microspheres with different sizes and/or unique optical codes were obtained with stability and homogeneity in aqueous solutions for a long time. Analysis of the obtained microspheres by dynamic light scattering, epifluorescence microscopy and flow cytometry methods showed their suitability for multiparameter analysis. At the same time, the use of quantum dots for optical encoding made it possible to exclude photodegradation of the signal and provided the possibility of excitation of all populations by the same wavelength of radiation with effective separation of signals from microspheres in different channels of a standard flow cytometer.

**Keywords:** microspheres, quantum dots, fluorescence, multiparametric analysis, flow cytometry, diagnostics