

БИОЛОГИЯ

УДК 616.006.02.009.097

Е. А. ПЕТРОВА¹, Т. И. ТЕРПИНСКАЯ¹, М. В. АРТЕМЬЕВ², академик В. С. УЛАЩИК¹ПОЛУПРОВОДНИКОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ СЕЛЕНИДА КАДМИЯ
КАК ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ МАРКЕРЫ¹Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь
helena_iseu@mail.ru; terpinskayat@mail.ru; biblio@fizio.bas-net.by²НИИ физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь
m_artemyev@yahoo.com

Исследованы цитотоксичность и поглощение клетками флуоресцентных полупроводниковых наночастиц CdSe/ZnS с различным типом оболочки. Поглощение флуоресцентных полупроводниковых наночастиц клетками в условиях *in vitro* зависит от конструкции наночастицы (состава оболочки и, в меньшей степени, от размера ядра), типа клеток и степени их дифференцировки. Цитотоксичность флуоресцентных полупроводниковых наночастиц селенида кадмия обусловлена структурой их оболочки. Показана возможность неспецифической маркировки клеток *in vitro* с использованием наночастиц с покрытиями из цистеина, меркаптоундекановой кислоты и тиогликолиевой кислоты. Функционализация покрытых карбоксиметилдекстраном флуоресцентных полупроводниковых наночастиц фибронектином обеспечивает усиление их связывания с целевыми клетками опухолей *in vitro*. Наночастицы с оболочкой из цистеина могут служить для визуализации клеток в лимфоузлах *in vivo* при внутрибрюшинном введении.

Ключевые слова: полупроводниковые нанокристаллы, флуоресцентные маркеры, поглощение клетками, цитотоксичность.

E. A. PETROVA¹, T. I. TERPINSKAYA¹, M. V. ARTEMYEV², V. S. ULASHCHYK¹

SEMICONDUCTOR NANOPARTICLES OF CADMIUM SELENIDE AS FLUORESCENT CELL MARKER

¹Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
helena_iseu@mail.ru; terpinskayat@mail.ru; biblio@fizio.bas-net.by²Institute for Physico-Chemical Problems of Belarusian State University
m_artemyev@yahoo.com

Cytotoxicity and the cellular uptake of different-coated fluorescent semiconductor nanoparticles CdSe/ZnS were studied. The cellular uptake of fluorescent semiconductor nanoparticles *in vitro* depends on the nanoparticle construction (coating composition and to a lesser extent on the core size), the type of cells, and the stage of cell differentiation. Cytotoxicity of fluorescent semiconductor nanoparticles is determined by the coating composition. Non-specific labeling of cells was demonstrated *in vitro* using fluorescent semiconductor nanoparticles coated with cysteine, and mercaptoundecanoic and thioglycolic acids. Fibronectin-modified fluorescent semiconductor nanoparticles with carboxymethyl-dextran-shell bind by target tumor cells *in vitro*. Nanoparticles coated with cysteine are suitable for cell visualization in lymph nodes after intraperitoneal injection.

Keywords: semiconductor nanocrystals, fluorescent markers, cellular uptake, cytotoxicity.

Введение. Современная биология и медицина характеризуются интенсивным развитием клеточных технологий, что обуславливает интерес к поиску новых клеточных маркеров и методов, позволяющих визуализировать клетки и клеточные структуры. Наиболее распространенными в настоящее время клеточными маркерами являются органические красители, основным недостатком которых является быстрое выгорание. Это ограничивает время проведения исследований, что особенно существенно при приготовлении и анализе препаратов для микроскопии. Кроме того, каждый краситель характеризуется свойственным ему довольно узким пиком возбуждения, что не позволяет осуществлять одновременный многоцветный анализ клеток, маркированных различными красителями.

Вместе с тем к настоящему времени разработан ряд флуорофоров, значительно превосходящих органические красители по яркости и длительности свечения. Среди них – флуоресцентные полупроводниковые наночастицы, получившие в научной литературе название «квантовых точек (КТ)». По яркости и фотостабильности они во много раз превышают традиционные флуорофоры: покрытые гидрофильной оболочкой наночастицы CdSe/ZnS в 20 раз ярче и в 100 раз стабильнее, чем родамин 6G, и не теряют интенсивности флуоресценции после 14 ч экспозиции на свету [1]. Широкая полоса возбуждения и узкие пики флуоресценции (зависящие от состава и размера ядра полупроводниковых наночастиц) [2] предоставляют возможности для одновременного многоцветного анализа не только методами проточной цитометрии, но также и флуоресцентной микроскопии. Дополнительные преимущества дает возможность модификации поверхности наночастиц для обеспечения избирательного взаимодействия с биологическими объектами и поведения в биологических средах. Все это обуславливает перспективность использования полупроводниковых наночастиц как флуоресцентных зондов для маркировки клеток.

Наиболее актуальной задачей в этой области является исследование взаимодействия флуоресцентных наночастиц с живыми клетками и разработка наноконструкций, удовлетворяющих требованиям прижизненных маркеров – биосовместимостью, а также способностью проникать в клетку или стабильно связываться с клеточной мембраной. В сообщении представлены результаты исследования полупроводниковых наночастиц на основе селенида кадмия как флуоресцентных меток для прижизненной маркировки клеток. Изучено поглощение наночастиц различными типами клеток, влияние наночастиц на жизнеспособность, оценена возможность использования наночастиц с различными типами покрытий для маркировки клеток *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы исследования. *Экспериментальные животные.* Мыши линии Af: самцы и самки весом 18–25 г и нелинейные крысы разведения вивария Института физиологии Национальной академии наук Беларуси.

Клетки. Клетки мышинных перевиваемых опухолей асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и гепатомы 22а (Г22а) получали из асцитической жидкости животных на 7–20 день роста опухоли. Клетки отмывали от асцитической жидкости в растворе Хенкса центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин.

Культуры мезенхимальных стволовых клеток мыши. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) получали из красного костного мозга или жировой ткани и культивировали согласно [3]. Для эксперимента использовали МСК 1–4 пассажей.

Лейкоциты периферической крови человека. Использовали периферическую кровь, стабилизированную К₂-ЭДТА. Эритроциты лизировали с помощью раствора хлорида аммония, а лейкоциты дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере. Полученную фракцию суспендировали в физиологическом рабочем растворе.

Наночастицы. Полупроводниковые наночастицы селенида кадмия с эпитаксиальной пленкой из сульфида цинка толщиной 2–4 монослоя (CdSe/ZnS) были синтезированы согласно методу [4]. В работе использовались нанокристаллы с максимумами испускания в пределах от 540 до 610 нм. Для достижения гидрофильности кристаллическую структуру CdSe/ZnS покрывали оболочкой из молекул бифункциональных тиолов (цистеина (Ц), цистеамина (ЦА), меркаптоундекановой кислоты (МУК), тиогликолиевой кислоты), полиэтиленгликолей (ПЭГ), карбоксиметилдекстрана (КМД), а также их сочетаний. В ряде случаев наночастицы были дополнительно стабилизированы бычьим сывороточным альбумином (БСА). Ядра наночастиц были синтезированы в Институте физико-химических проблем БГУ, оболочки – в Институте химии новых материалов НАН Беларуси. При комбинировании ядер различного размера и оболочек различного состава было синтезировано и протестировано 27 типов наночастиц.

Основными методами исследований являлись флуоресцентная микроскопия (микроскоп Планар МикроМБ и Оптон ИСМ405) и проточная цитометрия (цитофлуориметр BD FACS Canto II).

Полученные результаты обрабатывали непараметрическими методами статистики, отличия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. *Цитотоксичность наночастиц.* Все наночастицы были исследованы на цитотоксичность в скрининговых исследованиях с использованием различных типов

клеток – клеток экспериментальных опухолей животных (асцитная карцинома Эрлиха, гепатома 22а); клеток иммортальных опухолевых линий (рак легкого человека А549, глиома крыс С6); нормальных клеток (мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани и костного мозга, лейкоциты периферической крови человека, клетки селезенки, лимфатических узлов, перитонеальной полости и костного мозга мыши).

Практически все типы наночастиц в той или иной степени влияют на жизнеспособность и функции клеток. Гибель клеток в присутствии наночастиц происходила как по механизму некроза, так и по механизму апоптоза. Например, один из полиэтиленгликолей (1-меркаптоундек-11-гексаэтиленгликоль–ОН) в составе оболочки наночастиц обуславливал их выраженное токсическое действие. При концентрации 0,025 мг/мл такие наночастицы вызывали апоптоз, а при концентрациях выше 0,025 мг/мл – некроз клеток. Остальные, менее токсичные наночастицы, вызывали повреждения клеток при концентрациях свыше 0,1 мг/мл. Наночастицы, показавшие высокую цитотоксичность, были исключены из дальнейших исследований.

В экспериментах не выявлено зависимости цитотоксичности наночастиц, покрытых МУК или цистеином и сохраняющих коллоидную стабильность в растворе, от размера ядра наночастиц (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Снижение жизнеспособности лейкоцитов перитонеального смыва мыши при 5-часовой инкубации с различными типами наночастиц (Ме (25–75 %))

Размер ядра, нм	Максимум флуоресценции ядра, нм	Оболочка наночастицы	
		МУК	Цистеин
1,7	546	30 % (7–33 %)*	12 % (6–22 %)*
2,4	551	35 % (25–67 %)*	13 % (5–18 %)*
2,8	586	34 % (19–51 %)*	12 % (3–23 %)*

П р и м е ч а н и е. * – отличия достоверны по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

Поглощение наночастиц клетками. Поглощение наночастиц клетками, как и следовало ожидать, зависело от всех параметров системы: структуры наночастиц (состава оболочки и размера ядра наночастицы), клеток (типа клеток, степени дифференцировки), среды и времени инкубации.

При исследовании поглощения клетками наночастиц с различным типом оболочки показано проникновение в клетки наночастиц с покрытием из цистеина, меркаптоундекановой кислоты, и в случаях сохранения коллоидной стабильности суспензий – цистеинамина. Не поглощались или очень слабо поглощались клетками наночастицы с покрытиями, в состав которых входил карбоксилированный декстран и полиэтиленгликоль. Ряд образцов наночастиц с покрытиями на основе полиэтиленгликоля (МУК : ПЭГ в соотношении 1 : 9 и 9 : 1, Ц : МУК в соотношении 4 : 1, ЦА : тиопропанол в соотношении 1 : 1, биотин-БСА-фолиевая кислота, альгиновая кислота) не поглощались клетками экспериментальных опухолей и фагоцитами.

В большинстве случаев наночастицы поглощали клетки, способные к фагоцитозу – макрофаги перитонеальной полости, клетки селезенки, костного мозга, лимфатических узлов, а также мезенхимальные стволовые клетки, полученные из жировой ткани или костного мозга мыши. Последние, хотя и не являются профессиональными фагоцитами, также могут проявлять фагоцитарную активность [5]. Не было выявлено значительных различий в поглощении КТ фагоцитами различного тканевого происхождения. В то же время не способные к фагоцитозу клетки экспериментальных опухолей в ряде случаев поглощали наночастицы с оболочкой из бифункциональных тиолов (покрытые цистеином, меркаптоундекановой кислотой и тиогликолевой кислотой) (рис. 1).

Среди лейкоцитов периферической крови также наиболее активно поглощали наночастицы клетки, способные к фагоцитозу – моноциты и гранулоциты. Лимфоциты связывали наночастицы в меньшей степени. Данные по поглощению тиол-функционализированных флуоресцентных нанокристаллов лейкоцитами представлены в табл. 2.

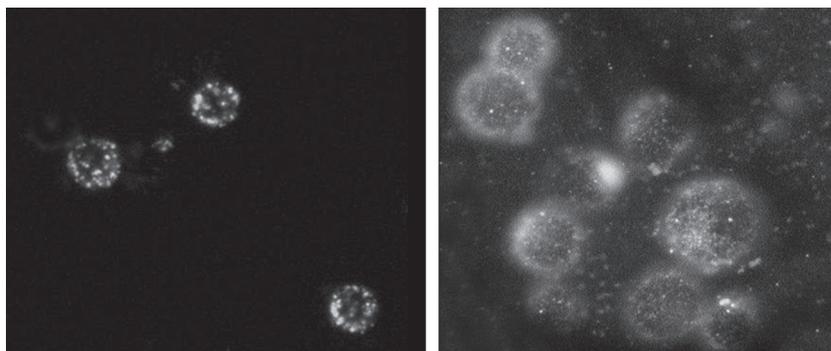


Рис. 1. Поглощение фагоцитирующими клетками перитонеальной полости мыши (слева) и клетками АКЭ (справа) наночастиц, покрытых цистеином

Т а б л и ц а 2. Поглощение лейкоцитами наночастиц с различным типом покрытия (Me (25–75 %))

Тип клеток	Содержание клеток, поглотивших наночастицы, (%)		Достоверность отличий (уровень значимости)
	Цистеин	КМД	
Активированные перитонеальные макрофаги мыши	62 (53,4–75,2)	21 (7–21,8)	$p < 0,05$
Нейтрофилы периферической крови человека	92,3 (88,8–97,5)	2,6 (1,4–6,1)	$p < 0,05$
Моноциты периферической крови человека	92,8 (81–99)	2,7 (1,9–5,1)	$p < 0,05$
Лимфоциты периферической крови человека	13,3 (3,6–31,7)	0,1 (0–0,2)	$p < 0,05$

Фагоцитирующие клетки периферической крови начинали поглощать наночастицы, покрытые КМД, только через 3 ч инкубации, в то время как наночастицы, покрытые только тиолами, поглощались уже в первые 15 мин.

При сравнении поглощения наночастиц с различным размером ядра, покрытых цистеином или меркаптоундекановой кислотой, показано, что наиболее эффективно поглощались наночастицы с наименьшим размером ядра (с максимумом флуоресценции $\lambda = 546$ нм). КТ ($\lambda = 546$ нм), покрытые цистеином, поглощались не только фагоцитами, но и опухолевыми клетками, в то время как наночастицы с большим размером ядра поглощались в основном фагоцитами и не окрашивали опухолевые клетки. Однако если покрытие не обеспечивает коллоидной стабильности суспензий наночастиц в среде инкубации, то происходит быстрая агрегация наночастиц, что подавляет их поглощение клетками. Ввиду того, что некоторые партии наночастиц, модифицированных тиолами, показывали низкую стабильность при хранении, наночастицы использовали в первые 24–48 ч после синтеза.

Так как поглощение является активным процессом, то на него могут оказывать влияние физиологические процессы и изменения, происходящие в клетках. На модели мезенхимальных стволовых клеток (МСК) была показана зависимость поглощения наночастиц от степени дифференцировки клеток. При инкубации с наночастицами, покрытыми цистеином, в течение 24 ч, недифференцированные МСК накапливали их в цитоплазматических везикулах. Окраска клеточных ядер красителем Hoechst 33342 позволила продемонстрировать, что везикулы с КТ располагаются вокруг ядер в недифференцированных клетках (рис. 2). При этом не выявлено апоптотических изменений ядер (конденсация хроматина, апоптотические тельца) клеток, поглотивших КТ. При дифференцировке в адипоциты клетки утрачивали способность к поглощению КТ. Проникновение наночастиц в клетки было характерно для участков колонии, не затронутых дифференцировкой, в то время как клетки, морфологически не отличимые от незрелых МСК, но находящиеся среди зрелых адипоцитов (и впоследствии дифференцированные в адипоциты), не окрашивались наночастицами. Это свидетельствует о том, что клетки уже на начальных стадиях дифференцировки утрачивают способность к поглощению изучаемых наночастиц.

Значительное влияние на свойства наночастиц оказывает состав среды. Так, инкубация в присутствии бычьего сывороточного альбумина или сыворотки (как сыворотки крови, так и эмбриональной телячьей сыворотки) снижала как поглощение наночастиц, так и их токсичность

в отношении клеток. Данные одного из репрезентативных экспериментов показывают снижение поглощения клетками АКЭ наночастиц, покрытых цистеамином, в 3 раза (с $69,2 \pm 1,6$ до $22,7 \pm 3,6$ % клеток, поглотивших наночастицы) и снижение токсичности в 2 раза ($10,5 \pm 1,6$ против $5,2 \pm 1,0$ % погибших клеток) при добавлении 10 % телячьей сыворотки в среду инкубации.

В то время как неспецифическое поглощение наночастиц обеспечивает окрашивание различных типов клеток, специфическое (целевое, или таргетное) связывание требует отсутствия неизбирательного проникновения в клетки, а также отсутствия захвата фагоцитами. Таким образом, препятствием при создании таргетных наноструктур является их неспецифическое поглощение, в первую очередь, фагоцитирующими клетками. В экспериментах *in vitro* на моделях фагоцитирующих клеток различного типа нами было показано, что для снижения неспецифического поглощения может служить покрытие из карбоксиметилдекстрана (КМД). КМД-покрытые наночастицы сохраняли коллоидную стабильность в водных суспензиях, а также в сбалансированных средах (раствор Эрла, ДМЕМ, раствор Хенкса, фосфатно-солевой буфер). КМД ингибировал неспецифическое поглощение наночастиц клетками. Так, в течение 3 ч инкубации КМД-КТ

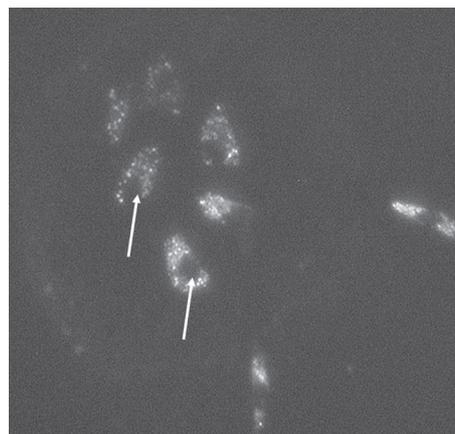


Рис. 2. Распределение цистеин-покрытых наночастиц в недифференцированных мезенхимальных стромальных клетках мыши. Стрелками показана локализация ядер клеток

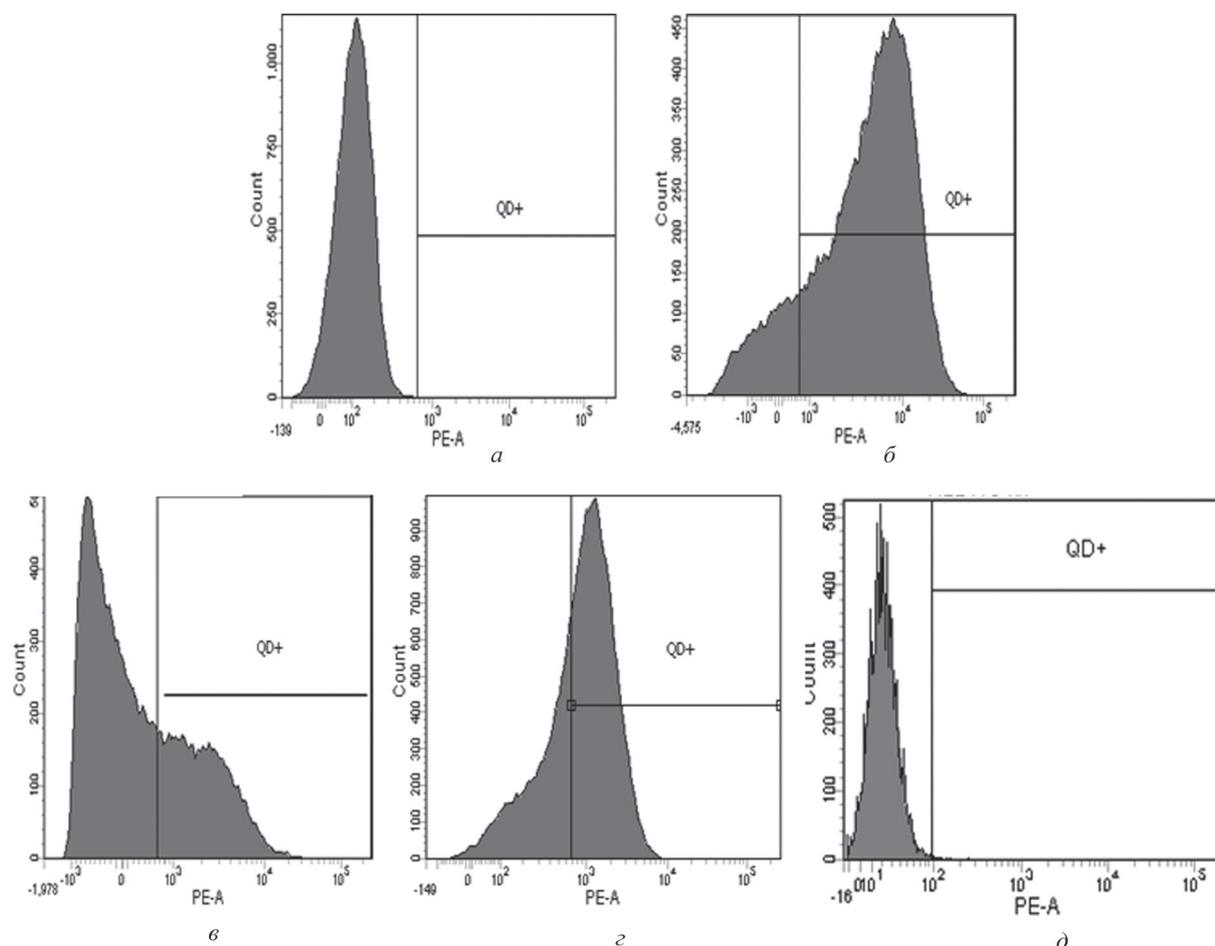


Рис. 3. Окрашивание клеток Г22а фибронектин-конъюгированными КТ при различных условиях: а – неокрашенный контроль, б – в растворе Хенкса, в – после обработки трипсином, г – в присутствии ЭДТА, д – контроль при инкубации с наночастицами, покрытыми КМД; по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции окрашенных наночастицами клеток, по ординат – количество клеток

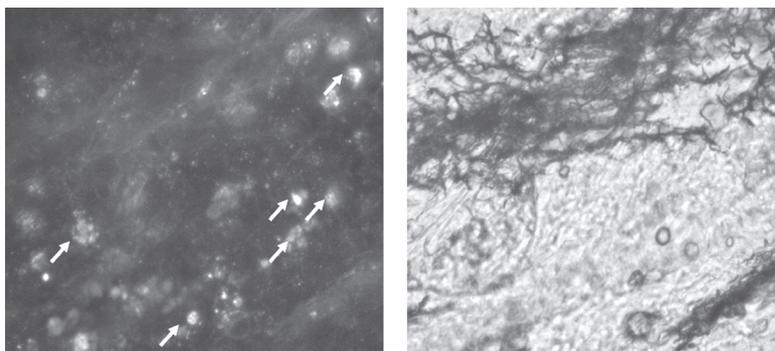


Рис. 4. Лимфатический узел мыши. Флуоресценция меченых наночастицами фагоцитов (указаны стрелками), мигрировавших из перитонеальной полости – люминесцентная микроскопия (слева) и проходящий свет (справа)

слабо поглощались как активированными перитонеальными макрофагами мыши, так и клетками периферической крови человека (табл. 2).

Наночастицы с оболочкой, снижающей неспецифическое поглощение фагоцитирующими клетками, могут быть использованы как основа для дальнейшей функционализации с целью придания им таргетности. Это призвано обеспечить связывание с заданными клеточными или субклеточными мишенями в организме. Опухолевые клетки несут на мембране рецепторы к белкам внеклеточного матрикса, в том числе к фибронектину (ФН) [6]. На клеточной модели экспериментальных асцитных опухолей мышей показана маркировка опухолевых клеток наночастицами с покрытием из КМД, функционализированными молекулами фибронектина.

В растворе Хенкса ФН-КТ окрашивали 71,3 (54,4–81,7) % клеток Г22а и были локализованы на цитоплазматической мембране в виде кластеров. Трипсин, расщепляющий рецепторы адгезии на мембране клеток, в 1,5–2 раза снижал количество окрашенных клеток, при этом интенсивность их флуоресценции (отражающая концентрацию КТ на поверхности клетки) падала в 3 раза (с 7 до 2,3 тыс. отн. ед.). Инкубация клеток с наночастицами в 0,9 %-ном растворе хлорида натрия обеспечивала яркость окрашивания на уровне 5,5 тыс. отн. ед., а присутствие ЭДТА еще больше снижало интенсивность свечения (более чем в 5 раз, с 7 до 1,3 тыс. отн. ед.), но не изменяло процентное содержание окрашенных клеток (рис. 3). Вероятно, данный результат обусловлен зависимостью процесса связывания фибронектина от ионов кальция, которые хелатируются ЭДТА [7].

Таким образом, покрытие кабркосиметилдекстраном обеспечивает возможность дальнейшей функционализации наночастиц таргетирующими молекулами, в частности, фибронектином.

Была также оценена возможность использовать флуоресцентные наночастицы для визуализации клеток и тканей *in vivo*.

В опытах *in vitro* частицы с покрытием из цистеина были наименее токсичны, однако при внутривенном введении животному в дозе 5 мг/кг (в объеме 0,1 мл) и выше проявляли острую токсичность – животные погибали в течение 1–2 мин, что, возможно, было обусловлено агрегацией КТ в крови и эмболизацией сосудов, так как *in vitro* наблюдалось оседание и агрегация КТ на клеточном дебрисе. При внутривенном введении аналогичных доз острой токсичности не зарегистрировано, не наблюдали изменений в поведении и внешнем виде животных. В клетках перитонеального смыва и брыжеечных лимфатических узлов через 24 ч после внутривенного введения наночастиц присутствовала ярко флуоресцирующая зернистость, свидетельствующая о поглощении и возможности обнаружения флуоресцентной метки (рис. 4).

Заключение. Полученные результаты позволяют заключить, что из изученных нами флуоресцентных маркеров пригодными для методов *in vitro* являются гидрофильные флуоресцентные полупроводниковые наночастицы CdSe/ZnS с поверхностной оболочкой из цистеина, меркаптоундекановой или тиогликолевой кислоты. Лучшее и наиболее стабильное проникновение в различные типы клеток и низкую цитотоксичность показали наночастицы с оболочкой из цистеина. Ввиду нестабильности коллоидных растворов тиол-покрытых наночастиц при длительном хранении, их рекомендуется использовать в течение 24–48 ч после синтеза оболочек.

Поглощение флуоресцентных полупроводниковых наночастиц клетками в условиях *in vitro* зависит от конструкции наночастицы (состава полимерной оболочки и, в меньшей степени, от размера ядра), типа клеток и степени их дифференцировки. Цитотоксичность наночастиц определяется типом оболочки и не зависит от размера ядра. Наиболее стабильно наночастицы поглощаются клетками, способными к фагоцитозу (моноцитами, нейтрофилами, макрофагами, а также мезенхимальными стволовыми клетками). Адипогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток снижает их способность к поглощению наночастиц. Функционализация покрытых карбоксиметилдекстраном флуоресцентных полупроводниковых наночастиц фибронектином значительно повышает связывание с целевыми опухолевыми клетками *in vitro*. Наночастицы с оболочкой из цистеина могут служить для визуализации клеток в лимфатических узлах *in vivo*, но путь их введения ограничен внутрибрюшинным из-за острой токсичности при внутривенном введении.

Список использованной литературы

1. Biological applications of quantum dots / T. Jamieson [et al.] // *Biomaterials*. – 2007. – Vol. 28. – P. 4717–4732.
2. (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites / B. O. Dabbousi [et al.] // *J. Phys. Chem. B*. – 1997. – Vol. 101. – P. 9463–9475
3. Витальная маркировка мезенхимальных стволовых клеток квантовыми точками на основе селенида кадмия / Е. А. Петрова [и др.] // *Лабораторная диагностика*. – 2012. – № 2. – С. 106–113.
4. Murray, C. B. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites / C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi // *J. Am. Chem. Soc.* – 1993. – Vol. 115. – P. 8706–8709.
5. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon / J. L. Chan [et al.] // *Blood*. – 2004. – Vol. 107. – P. 4817–4824.
6. Han, S. Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways / S. Han, F. R. Khuri, J. Roman // *Cancer Research*. – 2006. – Vol. 66, N 1. – P. 315–323.
7. Amphlett, G. W. The binding of calcium to human fibronectin / G. W. Amphlett, M. E. Hrinca // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1983. – Vol. 111, Iss. 3. – P. 1045–1053.

Поступило в редакцию 22.07.2015