

DOI: 10.7868/S0869813918060102

**ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК
ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ КВАНТОВЫХ
ТОЧЕК РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ В ХОДЕ ИМИДЖИНГА КЛЕТОК
В КУЛЬТУРЕ**

© И. К. Литвинов,^{1,2} Т. Н. Беляева,¹ А. С. Баженова,² Е. А. Леонтьева,¹
А. О. Орлова,² Е. С. Корнилова^{1–4}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: lik314@mail.ru

² Университет информационных технологий, механики и оптики,
Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

В работе изучены возможности использования полупроводниковых нанокристаллов, известных как квантовые точки (КТ), в качестве инструментов имиджинга микроскопических биологических объектов. Показано, что КТ на основе InP/ZnS с оболочками из ПЭГ с различными реактивными группами ($-\text{NH}_2$ и $-\text{COOH}$) и КТ на основе CdSe/ZnS с оболочкой из L-цистеина способны накапливаться в клетках макрофагов линии J774 и в клетках эпителиального происхождения линии HeLa. Выявлено, что в процессе накопления КТ не происходит смещения положения максимума люминесценции. Тем не менее при анализе внутриклеточного накопления следует учитывать изменения фотофизических характеристик КТ под действием внешнего окружения.

Ключевые слова: квантовые точки CdSe и InP, фотолюминесценция, макрофаги J774, клетки HeLa.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 676—682. 2018

I. K. Litvinov,^{1,2} T. N. Belyaeva,¹ A. S. Bazhenova,² E. A. Leontieva,¹ A. O. Orlova,² E. S. Kornilova.^{1–4} THE RESEARCH OF PHOTOPHYSICAL PROPERTIES OF LUMINESCENT SEMICONDUCTOR QUANTUM DOTS OF VARIOUS STRUCTURES DURING THE IMAGING OF CELLS IN CULTURE. ¹ Institute of Cytology of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: lik314@mail.ru; ² ITMO University, St. Petersburg, Russia; ³ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia; ⁴ Saint Petersburg University, St. Petersburg, Russia.

In this work we investigate the opportunities of using semiconductor nanocrystals, known as quantum dots (QDs), as a tool for imaging microscopic biological objects. It has been shown that QDs based on InP/ZnS with PEG shells with various reactive groups ($-\text{NH}_2$ and $-\text{COOH}$) and CdSe/ZnS QDs with L-cysteine shell can accumulate in macrophage cells of the J774 line and in epithelial origin cells of the HeLa line. It was revealed that during the accumulation of QDs, the

position of the luminescence maximum does not shift. Nevertheless, during the analysis of intracellular accumulation, it is necessary to take into account changes in the photophysical characteristics of QDs under the influence of an external environment.

Key words: CdSe and InP quantum dots, photoluminescence, macrophages J774, HeLa cells, pH.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 676—682. 2018

В настоящее время для имиджинга биологических объектов активно начинают использовать полупроводниковые нанокристаллы, известные как квантовые точки (КТ). Подобные наноструктуры обладают уникальными спектрально-люминесцентными свойствами, такими как зависимое от химического состава ядра и его размера излучение, покрывающее спектр от видимых до инфракрасных длин волн, большие коэффициенты поглощения в широком спектральном диапазоне, высокие уровни яркости и фотостабильности, узкие спектры люминесценции. Нанокристаллы имеют ядра размером 2—10 нм, состоящие из молекул на основе элементов II—VI или III—V групп Периодической системы, таких как CdSe, CdTe, InP и др. [5]. В большинстве случаев для увеличения квантового выхода люминесценции ядро покрывают слоем ZnS. Синтезированные нанокристаллы, обычно являющиеся гидрофобными, для обеспечения растворимости в водных растворах покрывают органической оболочкой. Наличие свободных групп на поверхности органической оболочки позволяет создавать наноструктуры, содержащие помимо КТ различные антитела, пептиды и малые молекулы, обеспечивающие таргетную доставку наноструктур в клетки. Чаще всего в качестве органической оболочки применяется полиэтиленгликоль (ПЭГ), так как он является химически инертным, а в его составе имеются первичные гидроксильные радикалы, которые позволяют получать различные производные с активными функциональными группами [11, 17]. Показано, что ПЭГ уменьшает неспецифическое связывание и поглощение КТ клетками [8]. Также важно отметить, что оболочка из ПЭГ значительно увеличивает размеры наноструктуры. Альтернативным вариантом материала для органической оболочки является цистеин. Данное соединение способно связываться с поверхностью КТ благодаря тиольной группе, а наличие карбоксильной и аминогруппы позволяет создавать многокомпонентные зондовые системы. Исследовательская группа W. Bai, R. K. Mehra [3] впервые синтезировали нанокристаллические полупроводники на основе ZnS с цистеиновым покрытием в 1998 г., однако такие нанокристаллы еще недостаточно изучены. Таким образом, первой задачей данного исследования являлось изучение возможности мечения клеток с помощью КТ на основе CdSe/ZnS с L-цистеином, а также КТ на основе InP/ZnS, покрытые ПЭГ, содержащим реактивные группы —COOH и —NH₂. Второй задачей было изучение изменений спектрально-люминесцентных характеристик данных КТ в клетках и модельных растворах.

МЕТОДИКА

Макрофагоподобные клетки асцита мыши линии J774 и клетки карциномы человека линии HeLa (Российская коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) культивировали во флаконах 25 см² (Nunc, США) в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 20 мМ глюкозамина, 10 % сыворотки крови плодов коровы, 0.1 % гентамицина в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. Клетки для экспериментов сеяли на чашки Петри (Nunc, США) или на покровные стекла в чашках Петри. Эксперименты проводили через 48 ч при достижении клетками 60—70 % монослоя. Все КТ в необходимых концентрациях (по 20 нМ КТ на основе InP/ZnS и 50 нМ КТ на основе CdSe/ZnS) добавляли в среду культивирования клеток на 24 ч.

В процессе исследования использовались КТ на основе CdSe/ZnS диаметром 6 нм с максимумом люминесценции при 570 нм, которые были синтезированы на базе Университета ИТМО (образец SPb36). Исходно гидрофобные КТ были солюбилизированы с помощью покрытия их поверхности L-цистеином методом межфазного переноса. Кроме того, применялись КТ на основе InP/ZnS с оболочкой из ПЭГ: КТ покрытые ПЭГ с NH₂-группами (КТ-ПЭГ-NH₂) и покрытые ПЭГ с COOH-группами (КТ-ПЭГ-COOH). Максимумы люминесценции КТ-ПЭГ-NH₂ и КТ-ПЭГ-COOH были при 640 нм (Mesolight, Китай).

В данной работе была проведена визуализация наноструктур в клетках с помощью конфокальной микроскопии (Olympus FV3000, Япония). Использовали иммерсионный объектив 60/1.42×. Флуоресценцию всех КТ возбуждали лазером при 405 нм и регистрировали в областях 520—620 (для CdSe/ZnS) и 600—680 нм (для InP/ZnS). Регистрировали одиночные срезы или серийные Z-серии с шагом 0.5 мкм (10—20 последовательных оптических срезов). Кроме того, флуоресценцию КТ исследовали с помощью режима спектрального сканирования (Mode/хуλ) в интервале 520—700 нм с шагом 5 нм.

Спектрально-люминесцентные свойства КТ исследовали методами стационарной оптической спектроскопии. Анализировали растворы КТ в PBS (pH 7.4 и 4.0) в концентрации 25 нМ. Спектры фотолюминесценции растворов КТ регистрировали на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Aligent, США). Для измерения времен затухания люминесценции КТ применяли лазерный сканирующий люминесцентный микроскоп MicroTime 100 (PicoQuant, Германия). В настоящей работе распады люминесценции наноструктур были зарегистрированы с использованием интерференционных оптических фильтров, прозрачных в областях на 570 и 640 нм для регистрации люминесценции КТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены схемы используемых в исследовании КТ. Поскольку данные КТ не имеют таргетных молекул на поверхности органических оболочек, они проникают в клетки неспецифическим путем. Важно отметить, что наличие ПЭГ минимизирует неспецифическое связывание, поэтому исследование КТ-ПЭГ, вошедших в клетки в достаточном для анализа количестве, выполнено на примере макрофагоподобных клеток асцита мыши линии J774. В то же время в случае КТ, солюбилизированных L-цистеином, использовались клетки линии HeLa.

На первом этапе работы мы изучали проникновение КТ 640 на основе InP/ZnS с оболочкой из ПЭГ (КТ-ПЭГ-COOH и КТ-ПЭГ-NH₂) в клетки линий J774 и КТ 570 на основе CdSe/ZnS, покрытых L-цистеином, в клетки линий HeLa, а также характер внутриклеточной локализации через 24 ч после добавления наноструктур. Анализ изображений клеток с КТ, полученных с помощью конфокальной

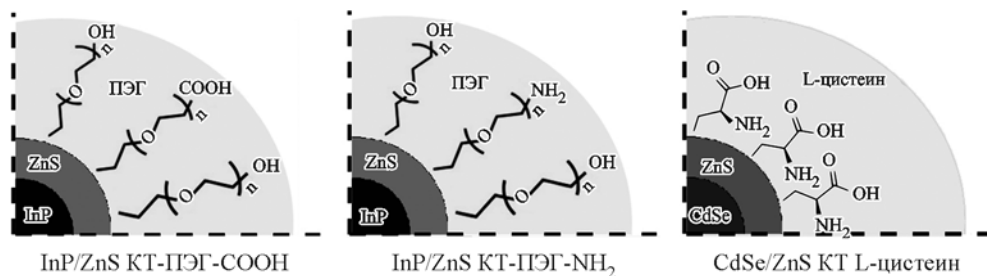
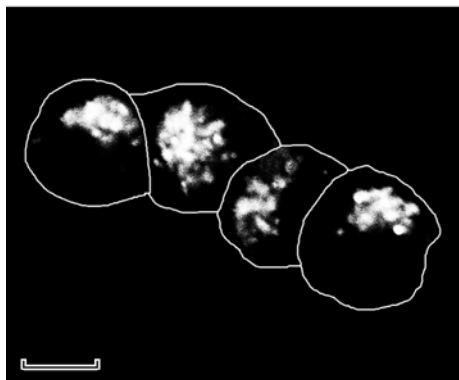
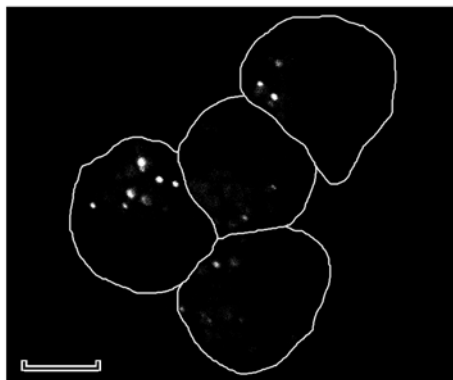


Рис. 1. Схемы строения наноструктур (ядро и оболочки), используемых в исследовании: InP/ZnS КТ-ПЭГ-COOH, InP/ZnS КТ-ПЭГ-NH₂, CdSe/ZnS КТ L-цистеин.

InP/ZnS КТ-ПЭГ-СООН
в клетках J774



InP/ZnS КТ-ПЭГ-NH₂
в клетках J774



CdSe/ZnS КТ L-цистеин в клетках HeLa

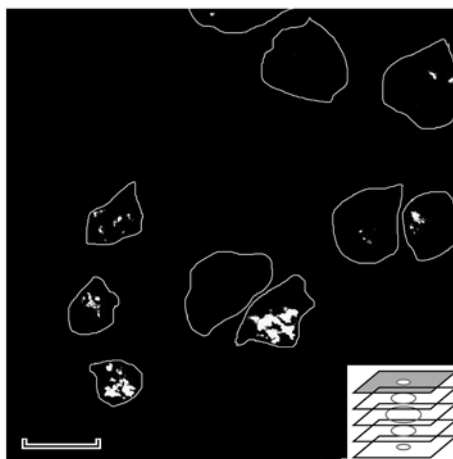
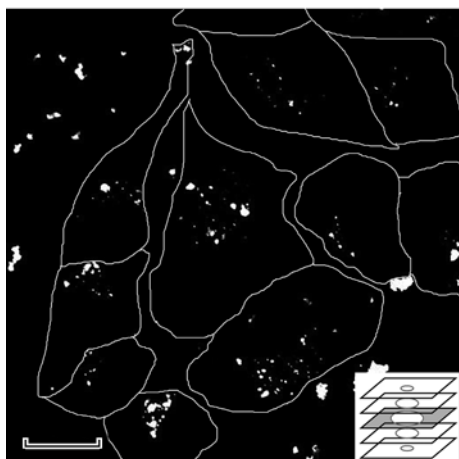


Рис. 2. Конфокальные изображения КТ в клетках (границы клеток указаны контуром в соответствии с собственной люминесценцией клеток) при возбуждении лазером при 405 нм. Изображения InP/ZnS КТ в макрофагах получены наложением серийных Z-серий с шагом 0.5 мкм. Изображения CdSe/ZnS КТ в клетках HeLa представлены двумя срезами, полученными в средней и верхней частях клеток. Масштабные отрезки: 10 мкм.

микроскопии (рис. 2) показывает, что все КТ проникают в клетки и локализуются в везикулоподобных структурах. Аналогичные структуры были обнаружены в более ранних исследованиях при применении CdSe/ZnS КТ с ПЭГ, конъюгированных со стрептавидином [12, 13]. Однако для КТ-ПЭГ-СООН характерно более диффузное распределение с единичными яркими структурами. КТ-ПЭГ-NH₂ выявляются в подавляющем большинстве в дискретных везикулоподобных структурах, с наибольшей степенью вероятности являющихся эндосомами/фагосомами. В случае взаимодействия цистеиновых КТ с клетками наблюдаются как КТ в везикулоподобных структурах, так и КТ, связанные с внешней стороной мембран клеток, поскольку видно, что некоторая часть КТ не проникает в клетки.

В процессе применения КТ в биологических и медицинских исследованиях нанокристаллы специфическим или неспецифическим способом проникают в клетки, при этом КТ могут подвергаться различным повреждающим факторам,

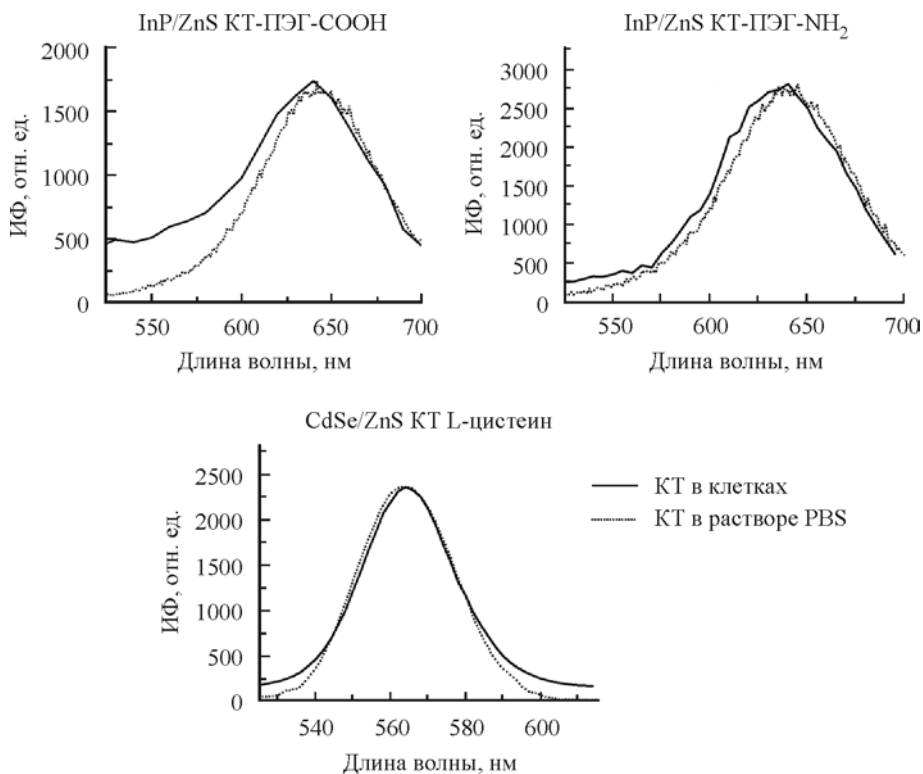


Рис. 3. Спектры люминесценции КТ, полученные на конфокальном микроскопе при спектральном сканировании конгломератов КТ в клетках, и нормированные спектры этих же КТ в растворе PBS при pH 7.4, полученные на спектрофлуориметре.

таким как фотолиз, окисление, низкое значения pH и т. п. [1, 2, 4, 7, 16]. Под действием подобных факторов может происходить разрушение целостности КТ с последующим выходом материала в окружающую среду. Как следствие, в результате этого процесса могут измениться и фотофизические характеристики наноструктур. Поэтому важно отметить, что как неорганическая оболочка (слой ZnS), так и органическая (ПЭГ, цистеин и т. п.) играют важную роль в обеспечении целостности структуры КТ. Проблема целостности КТ напрямую связана с вопросом цитотоксичности наноструктур, а также с вопросом адекватности интерпретации анализа люминесцентного сигнала при его регистрации в процессе имиджинга биологического объекта. В связи с этим были исследованы спектрально-люминесцентные свойства КТ в растворах PBS и внутри клеток. На рис. 3 представлены репрезентативные спектры люминесценции КТ-ПЭГ-COOH, КТ-ПЭГ-NH₂ и КТ с L-цистеином. Видно, что максимумы люминесценции соответствуют максимумам люминесценции в растворах PBS (спектры нормированы по максимальному значению люминесценции).

В последние годы методы обработки и анализа флуоресцентных изображений клеток получили очень широкое распространение, в частности для оценки количественных параметров динамики таких процессов, как эндоцитоз [6, 15]. При анализе и оценке накопления КТ в клетках важно учитывать, что наноструктуры могут накапливаться в кислых компартаментах клеток. В связи с этим необходимо оценить изменения спектрально-люминесцентных свойств в модельной системе при pH, соответствующем pH кислых компарментов клеток, по сравнению с нейтральным pH. На рис. 4 представлены спектры люминесценции исследуемых

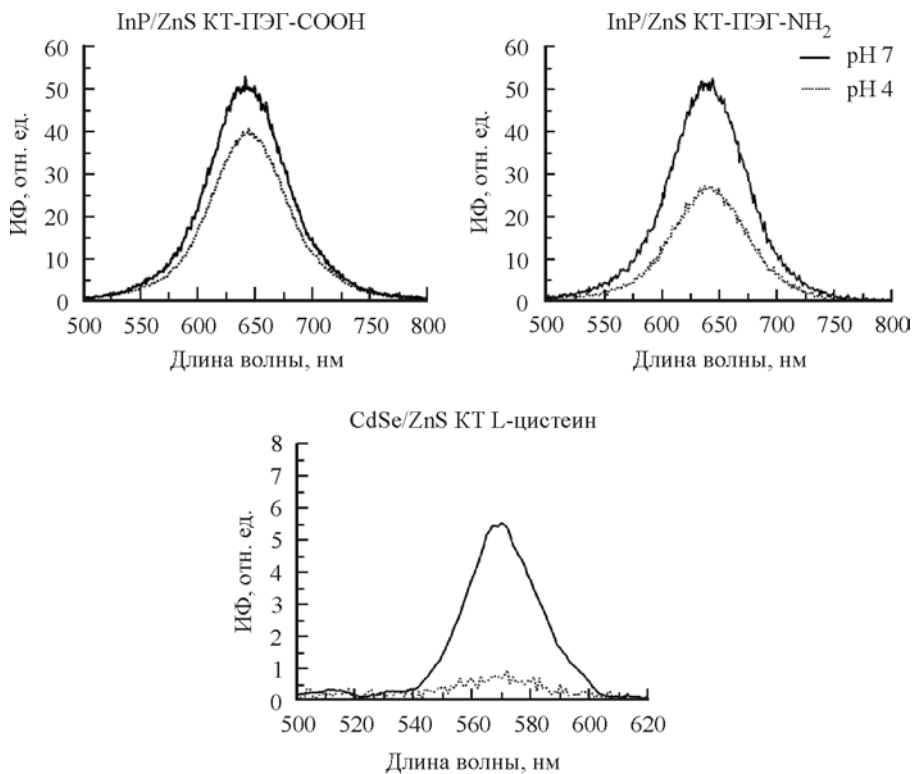


Рис. 4. Изменение интенсивности люминесценции InP/ZnS KT-ПЭГ-COOH, InP/ZnS KT-ПЭГ-NH₂ и CdSe/ZnS KT L-цистеин в растворах PBS при повышении его кислотности. Люминесценция возбуждалась светом с длиной волны 405 нм. Значения pH раствора 7.4 и 4.0. ИФ — интенсивность фотолюминесценции.

КТ в растворах PBS с разным значением pH (pH 4 и 7.4). Показано, что уровень интенсивности люминесценции при выдерживании InP/ZnS KT-ПЭГ-COOH в растворе PBS при pH 4 снижается на 19.4 %, в случае же InP/ZnS KT-ПЭГ-NH₂ интенсивность люминесценции снижается на 52 %. В аналогичных условиях интенсивность люминесценции CdSe/ZnS КТ с L-цистеином снижается примерно на 80 %. Анализ кинетики люминесценции показал, что времена жизни люминесценции КТ снижаются в растворах с pH 4 по сравнению с pH 7.4. В случае с КТ-ПЭГ-COOH и КТ-ПЭГ-NH₂ времена жизни люминесценции падают с 23 до 21.6 нс и с 19.7 до 18 нс соответственно. В то же время времена жизни люминесценции КТ с цистеином падают с 2.9 до 0.86 нс. Таким образом, видно, КТ с ПЭГ показали себя более устойчивыми к изменению внешнего окружения, что подтверждает результаты более ранней работы [10].

В данной работе показано, что все три типа наноструктур, независимо от состава ядра и оболочки, обнаруживаются в клетках в виде компарментов, доступных для анализа спектрально-люминесцентных характеристик. Важно отметить, что КТ на основе InP рассматриваются в качестве перспективной альтернативы CdSe КТ, в связи с тем что Cd является токсичным элементом. Известно, что выход ионов Cd²⁺ в цитоплазму может привести к последующему их присоединению к различным белкам через сульфгидрильные группы и нарушению внутриклеточных процессов [9, 14]. В связи с этим актуальной задачей было исследование возможностей КТ как на основе InP/ZnS, так и CdSe/ZnS. Кроме того, в связи с тем что КТ могут подвергаться различным повреждающим факторам, для изу-

чения распределения наноструктур в клетках важно учитывать влияние уровня pH на фотофизические свойства КТ.

Работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН № 32 «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] *Aldana J., Lavelle N., Wang Y. J., Peng X. G.* Size-dependent dissociation pH of thiolate ligands from cadmium chalcogenide nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2496—2504. 2005.
- [2] *Aldana J., Wang Y. A., Peng X.* Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 8844—8850. 2001.
- [3] *Bai W., Mehra R. K.* Cysteine-capped ZnS nanocrystallites: preparation and characterization. *J. Inorg. Biochem.* 70: 125—135. 1998.
- [4] *Bentzen E. L., Tomlinson I. D., Mason J., Gresch P., Warnement M. R., Wright D., Sanders-Bush E., Blakely R., Rosenthal S. J.* Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assays. *Bioconjug. Chem.* 16: 1488—1494. 2005.
- [5] *Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A. P.* Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science.* 281: 2013—2016. 1998.
- [6] *Collinet C., Stoter M., Bradshaw C. R., Samusik N., Rink J. C., Kenski D., Habermann B., Buchholz F., Henschel R., Mueller M. S., Nagel W. E., Fava E., Kalaidzidis Y., Zerial M.* Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. *Nature.* 464: 243—249. 2010.
- [7] *Derfus A. M., Chan W. C. W., Bhatia S. N.* Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Lett.* 4: 11—18. 2004.
- [8] *Hild W. A., Breunig M., Goepferich A.* Quantum dots — nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68: 153—168. 2008.
- [9] *Kirchner C., Liedl T., Kudera S., Pellegrino T., Muñoz Javier A., Gaub H. E., Stölzle S., Fertig N., Parak W. J.* Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett.* 5: 331—338. 2005.
- [10] *Litvinov I. K., Belyaeva T. N., Salova A. V., Aksenov N. D., Leontieva E. A., Orlova A. O., Kornilova E. S.* Quantum dots based on indium phosphide (InP): the effect of chemical modification of the organic shell on interaction with cultured cells of various origins. *Cell Tissue Biol.* 12(2): 135—145. 2018.
- [11] *Monfardini C., Veronese F. M.* Stabilization of substances in circulation. *Bioconjug. Chem.* 9: 418—450. 1998.
- [12] *Salova A. V., Belyaeva T. N., Leontieva E. A., Kornilova E. S.* EGF receptor lysosomal degradation is delayed in the cells stimulated with EGF-Quantum dot bioconjugate but earlier key events of endocytic degradative pathway are similar to that of native EGF. *Oncotarget.* 8(27): 44 335—44 350. 2017.
- [13] *Salova A. V., Belyaeva T. N., Leontieva E. A., Zlobina M. V., Kharchenko M. V., Kornilova E. S.* Quantum dots implementation as a label for analysis of early stages of EGF receptor endocytosis: a comparative study on cultured cells. *Oncotarget.* 7(5): 6029—6047. 2016.
- [14] *Smith A. M., Duan H., Mohs A. M., Nie S.* Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 60: 1226—1240. 2008.
- [15] *Tonti S., Di Cataldo S., Bottino A., Ficarra E.* An automated approach to the segmentation of hep-2 cells for the indirect immunofluorescence ANA test. *Comput. Med. Imaging Graph.* 40: 62—69. 2015.
- [16] *Uyeda H. T., Medintz I. L., Jaiswal J. K., Simon S. M., Mattoussi H.* Synthesis of compact multidentate ligands to prepare stable hydrophilic quantum dot fluorophores. *Am. Chem. Soc.* 127: 3870—3878. 2005.
- [17] *Zalipsky S.* Functionalized Poly(ethylene glycols) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconjug. Chem.* 6 (2): 150—165. 1995.

Поступила 23 IV 2018