



УДК 544.031

© 2010

В. К. Клочков, Н. С. Кавок, Ю. В. Малюкин,
академик НАН України В. П. Семиноженко

Эффект специфического взаимодействия нанокристаллов $\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ с ядрами клеток

Синтезовано водні колоїдні розчини люмінесцентних нанокристалів $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ сферичної та веретеноподібної форми. Люмінесценція нанокристалів $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ ефективно збуджується у видимому діапазоні спектра та має значний стоксів зсув (більш ніж 200 нм), що дозволяє позбавитися шумового впливу автофлуоресценції біологічних об'єктів. За допомогою методів люмінесцентної спектроскопії та люмінесцентної мікроскопії показано, що нанокристали сферичної форми ефективно проникають в ізольовані гепатоцити та акумулюються переважно в ядерних структурах. Нанокристали, які мають веретеноподібну форму, в клітинах виявлені не були. Нанокристали $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ сферичної форми є ефективними неорганічними люмінесцентними маркерами і можуть використовуватися як контейнери для селективної доставки речовин у ядра клітин.

С развитием биологии и медицины увеличивается потребность в новых методах диагностики и мониторинга метаболических процессов в живом организме. Предполагается, что новые возможности, которые обеспечиваются развитием нанотехнологии, позволят решить целый ряд проблем в области молекулярной диагностики и терапии заболеваний.

Применение люминесцентных меток и зондов позволило значительно расширить диапазон и повысить чувствительность методов анализа в биомедицинских исследованиях [1, 2]. Традиционно для этой цели используют органические люминофоры. Однако ряд недостатков, таких как низкая фотостабильность, малый стоксов сдвиг люминесценции и токсичность, ограничивают их применимость.

С развитием нанотехнологий появилась возможность применения неорганических люминесцирующих меток и зондов, являющихся более стабильными к воздействию возбуждающего излучения и позволяющих проводить длительный мониторинг в биологических исследованиях. Наряду с поиском меток для выявления биомаркеров и селекции клеток, одним из многообещающих направлений является создание наноразмерных транспортирующих систем адресной доставки соединений к определенным биологическим структурам. В настоящее время стали широко применяться полупроводниковые квантовые точки, которые приобрели уже коммерческое использование в качестве нанозондов [3, 4]. Следует

отметить, что токсичность, эффект мерцания, относительно широкие полосы люминесценции ограничивают их применение.

В последнее время все больше уделяется внимание наноломинофорам на основе диэлектриков и широкозонных полупроводников, активированных редкоземельными элементами [5, 6]. Такие материалы обладают высокой фотостабильностью, большим Stokes shift сдвигом люминесценции, отсутствием эффекта мерцания, стабильностью характерных узких полос люминесценции. Доступные методы синтеза и модификации наночастиц, а также отсутствие значительной токсичности делают их перспективными для биологического и медицинского использования, однако недостаточная яркость люминесценции материала ограничивает их применение. Для регистрации люминесценции используют лазерное возбуждение и высокочувствительные CCD камеры [5, 7]. В настоящее время неорганические наноломинофоры, активированные редкоземельными элементами, пока интенсивно не используются в качестве меток и зондов в биологических исследованиях.

Нами были синтезированы водные растворы наноломинофоров на основе $\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$, обладающие яркой люминесценцией. Исследована возможность регистрации наночастиц в клетках гепатоцитов методами люминесцентной микроскопии и микроспектроскопии.

Материалы и методы. Методы получения и свойства водных коллоидных растворов наноломинофоров на основе ортованадатов редкоземельных элементов были описаны ранее [8, 9]. Наночастицы, стабилизированные динатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты, состава $\text{Gd}_{0,7}\text{Y}_{0,2}\text{Eu}_{0,1}\text{VO}_4$ исследовались в качестве биологических маркеров.

Свежевыделенные гепатоциты крыс инкубировали 90 мин в изотоническом 5%-ном растворе глюкозы, содержащем наночастицы с концентрацией 100 мг/л. После инкубации изолированных клеток с растворами наночастиц клетки были отмыты физиологическим раствором. После чего часть суспензии клеток была помещена в кварцевую кювету для измерения спектров люминесценции, а другая часть клеток использовалась для визуализации и измерения спектров люминесценции с локальных зон клетки в условиях люминесцентной микроскопии.

Для визуализации клеток применялся люминесцентный микроскоп Olympus IX71 с источником возбуждения — ксеноновой лампой 75 W. Для возбуждения люминесценции был использован фильтр, пропускающий 460–490 нм, и фильтр для наблюдения люминесценции, пропускающий от 510 нм. Микроскоп оснащен дополнительным каналом регистрации спектров, позволяющим анализировать спектры люминесценции наблюдаемых биологических объектов. Наблюдение изолированных клеток гепатоцитов крыс проводилось при увеличении X1000 в условиях масляной иммерсии.

Для получения спектров люминесценции водных растворов наноломинофоров и суспензии клеток использован монохроматор МДР-23 с системой управления и сбора информации в стандарте КАМАК и источником возбуждения — ксеноновой лампой 150 Вт.

Просвечивающая электронная микроскопия выполнена на ПЕМ-125 К (Selmi). Образцы были приготовлены методом нанесения капли исследуемого раствора на углеродную пленку.

Результаты и обсуждение. Цель данных исследований, с одной стороны, — исследование возможности использования нанокристаллических систем на основе ортованадатов редкоземельных элементов в качестве люминесцентных зондов для долговременного мониторинга за перемещением клеток и их локализацией в биологических экспериментах, с другой стороны, — определение влияния формы наночастиц на их способность проникать

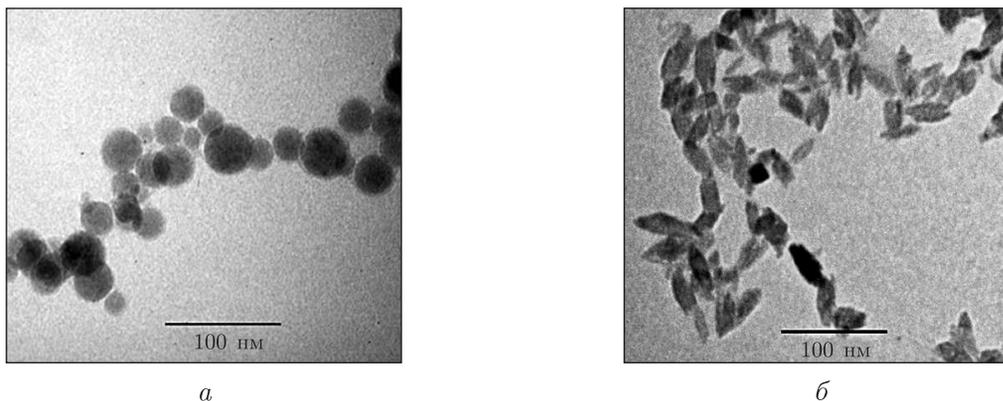


Рис. 1. Электронно-микроскопические фотографии твердой фазы из коллоидных растворов $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$: *a* — наночастицы сферической формы; *б* — веретенообразной формы

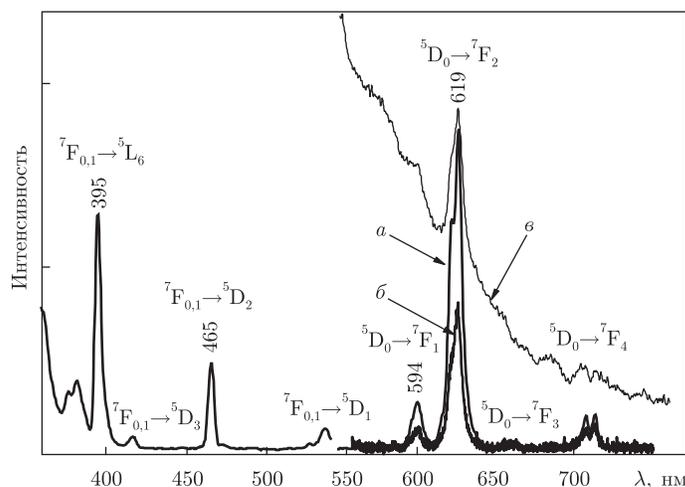


Рис. 3. Спектры возбуждения (слева) и люминесценции (справа): водного коллоидного раствора $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{возб}} = 395 \text{ нм}$) (*a*); суспензии клеток ($\lambda_{\text{возб}} = 395 \text{ нм}$) (*б*); ядра клетки ($\lambda_{\text{возб}} = 465 \text{ нм}$) (*в*)

внутри клетки. Для этого были приготовлены водные коллоидные растворы нанолюминофоров с одинаковым окружением и составом, но разной формой наночастиц (рис. 1). Как видно из рис. 1, *a*, твердая фаза раствора представляет собой полидисперсную систему сферических частиц со средним диаметром 22 нм, твердая фаза второго раствора (рис. 1, *б*) — полидисперсную систему веретенообразных наночастиц со средним размером $16 \times 40 \text{ нм}$ (усредненный диаметр 28 нм). Наночастицы в растворах обладают яркой красной люминесценцией при возбуждении ртутной лампой (рис. 2, *a*). В спектрах возбуждения и люминесценции наблюдаются характерные полосы активатора Eu^{3+} в ортованадатной матрице (рис. 3). Полученные спектры имеют сходство со спектрами для подобных систем и подробно описаны в литературе [6, 10, 11].

Основным преимуществом нанолюминофоров $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ является значительный стоксов сдвиг их люминесценции, что позволяет отделить автофлуоресценцию биологического материала от флуоресценции зонда. При использовании возбуждения 395 нм стоксов сдвиг флуоресценции нанокристаллов $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ превышает 200 нм, в то время как

стоксов сдвиг для флуоресцирующих органических зондов не превышает 150 нм. Для возбуждения люминесценции активированных редкоземельными элементами ортованадатов может быть использована полоса в области 270 нм, которая соответствует оптическому переходу с переносом заряда от кислородных лигандов к центральному атому ванадия в VO_4^{3-} . Последующий перенос энергии от основы к иону активатора в кристалле приводит к возбуждению и люминесценции европия с максимумом интенсивности в полосе 619 нм. В таком случае стоксов сдвиг для ортованадата, активированного европием, составит более 300 нм. Благодаря такому преимуществу можно обнаруживать наличие зондов в биоматериале по характерным узким полосам люминесценции европия в ортованадатной матрице.

На рис. 3, б представлен спектр люминесценции суспензии клеток после инкубации с раствором, содержащим сферические частицы (см. рис. 1, а). Положение полос люминесценции в спектре клеточной суспензии идентично спектру в исходном буферном растворе (см. рис. 3, а) и соответствует переходам ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_n$ трехвалентного европия в кристаллическом поле ортованадатной матрицы. Спектральная идентификация наночастиц в клетках полностью подтверждается люминесцентной микроскопией. При использовании фильтра возбуждения люминесценции 460–490 нм и фильтра для наблюдения люминесценции, пропускающего от 510 нм, наблюдается ярко-зеленая автофлуоресценция цитоплазматической области клетки гепатоцита в контроле, причем ядро клетки не люминесцирует (см. рис. 2, в). При наблюдении клеток, инкубированных с наноломинофорами, в условиях люминесцентной микроскопии обнаруживается красная люминесценция наночастиц в клетках (см. рис. 2, б). Особо интенсивная люминесценция наночастиц отмечается в области ядер гепатоцитов.

Люминесцентный микроскоп был усовершенствован путем добавления в оптическую схему микроскопа канала спектральной регистрации люминесценции наблюдаемых объектов, что позволило регистрировать спектр люминесценции на локальном участке наблюдаемого объекта. При позиционировании участков изолированной клетки в зоне регистрации спектра обнаружено, что на фоне автофлуоресценции клетки наблюдается узкая полоса с максимумом 619 нм, соответствующая переходу ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ наноломинофора $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ (см. рис. 3, в). Максимум интенсивности этой полосы находится в области ядра гепатоцита. Очевидно, что наночастицы проникают в клетки и концентрируются в ядрах.

Отметим, что эффект проникновения наночастиц обнаруживается только для частиц сферической формы (см. рис. 1, а). Клетки, инкубированные в растворе, содержащем наночастицы веретенообразной формы (см. рис. 1, б), визуально сходны с клетками в контроле (см. рис. 2, в). Наблюдается автофлуоресценция цитоплазматической части и отсутствует красная люминесценция наноломинофоров. В спектрах люминесценции также отсутствуют характерные переходы для $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$, что подтверждает отсутствие наночастиц веретенообразной формы в исследуемых клетках.

Лишь единичные работы свидетельствуют о связи формы наночастиц с их биологической активностью [12]. Обнаруженная нами способность проникновения наночастиц внутрь клеток в значительной мере зависит от формфактора, влияющего на трансмембранный транспорт. Несмотря на сходный усредненный размер частиц для обоих случаев, проникновение симметричных наночастиц через плазматическую мембрану более вероятно, чем для анизодиаметрических.

Важным преимуществом полученных частиц является их способность накапливаться в ядерных структурах. До настоящего времени проблема адресной доставки лекарственных

соединений или генетического материала в ядро клетки решается достаточно сложными методами. Сферические наночастицы с отрицательным зарядом поверхности, способные проникать в ядра, могут служить инструментом в исследовании механизмов внутриклеточного транспорта молекулярных форм и представлять основу при создании наноконтейнеров для селективной доставки лекарственных соединений.

Для выяснения детальных механизмов внутриклеточного транспорта наночастиц, их взаимодействия с мембранами и внутриклеточными органеллами, способности наночастиц влиять на метаболические процессы требуются отдельные исследования. Исследования последних лет показали, что взаимодействия неорганических наноматериалов с биологическими объектами в значительной мере зависят от размера, формы и окружения наночастиц и в меньшей степени — от их состава [13]. Поэтому рассмотренные в данной работе нанолюминофоры могут использоваться, с одной стороны, в качестве неорганических люминесцентных зондов, с другой стороны, они могут являться объектами для изучения влияния наноматериалов на элементы биологической материи и живого организма в целом.

1. Wang F., Tan W. B., Zhang Y. et al. Luminescent nanomaterials for biological labelling // *Nanotechnology*. – 2006. – **17**. – R1-R13.
2. Карнаухов В. Н. Люминесцентный спектральный анализ клеток. – Москва: Наука, 1978. – 204 с.
3. Bruchez M. Jr, Moronne M., Gin P. et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels // *Science*. – 1998. – **281**. – P. 2013. – 2016.
4. Alivisatos A. P., Gu W., Larabell C. Quantum dots as cellular probes // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* – 2005. – **7**. – P. 1–22.
5. Patra C. R., Bhattacharya R., Patra S. et al. Lanthanide phosphate nanorods as inorganic fluorescent labels in cell biology research // *Clinical Chemistry*. – 2007. – **53**, No 11. – P. 2029. – 2031.
6. Huignard A., Gacoin T., Boilot J.-P. Synthesis and luminescence properties of colloidal YVO₄ : Eu phosphors // *Chem. Mater.* – 2000. – **12**. – P. 1090–1094.
7. Beaurepaire E., Buissette V., Sauviat M.-P. et al. Functionalized fluorescent oxide nanoparticles: artificial toxins for sodium channel targeting and imaging at the single-molecule level // *Nano Lett.* – 2004. – **4**, No 11. – P. 2079. – 2083.
8. Клочков В. К. Водные коллоидные растворы нанолюминофоров $n\text{ReVO}_4$: Eu^{3+} (Re = Y, Gd, La) // *Наноструктурное материаловедение*. – 2009. – № 2. – С. 3–8.
9. Клочков В. К. Coagulation of luminescent colloid $n\text{GdVO}_4$: Eu solutions with inorganic electrolytes // *Functional materials*. – 2009. – **16**, No 2. – С. 141–144.
10. Huignard A., Buissette V., Franville A.-C. et al. Emission processes in YVO₄ : Eu nanoparticles // *J. Phys. Chem. B*. – 2003. – **107**. – P. 6754–6759.
11. Riwotzki K., Haase M. Wet-chemical synthesis of doped colloidal nanoparticles: YVO₄ : Ln (Ln) Eu, Sm, Dy) // *Ibid.* – 1998. – **102**. – P. 10129–10135.
12. Patra C., Bhattacharya R., Patra S. et al. Inorganic phosphate nanorods are a novel fluorescent label in cell biology // *J. Nanobiotechnology*. – 2006. – **4**. – P. 11.
13. Roiter Y., Ornatska M., Rammohan A. et al. Interaction of lipid membrane with nanostructured surfaces // *Langmuir*. – 2009. – **25**. – P. 6287–6299.

НТК “Институт монокристаллов”
НАН Украины, Харьков
Институт сцинтилляционных материалов
НАН Украины, Харьков

Поступило в редакцию 29.03.2010

V. K. Klochkov, N. S. Kavok, Yu. V. Malyukin,
Academician of the NAS of Ukraine **V. P. Seminozhenko**

The effect of a specific interaction of nanocrystals $\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ with cell nuclei

Water colloid solutions of luminescent nanocrystals $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ of spherical and spindle-shaped forms have been synthesized. The luminescence of $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ is effective in the visible spectrum with the Stokes shift more than 200 nm, which eliminates the autofluorescence of biological objects. Luminescent spectroscopy and microscopy have revealed that spherical nanocrystals effectively penetrate into isolated hepatocytes and amass mostly in nuclear structures. Spindle-shaped nanocrystals escape detection in cells. Spherical nanocrystals $n\text{GdYVO}_4 : \text{Eu}^{3+}$ are effective inorganic luminescent probes which can be used for the selective delivery of substances into cell nuclei.