

КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ CdS, ПОЛУЧЕННЫЕ ПУТЕМ «ЗЕЛЕННОГО» СИНТЕЗА: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ТОКСИЧНОСТИ И ВЛИЯНИЯ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ И АДГЕЗИОННУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Л.В. ГАРМАНЧУК^{1,1}, М.Н. БОРОВАЯ^{1,2}, А.А. НЕГЕЛЯ², М. ИНОМИСТОВА²,
Н.Н. ХРАНОВСКАЯ^{3,4}, А.Н. ТОЛСТАНОВА², Я. Б. БЛЮМ¹, А.И. ЕМЕЦ^{1,3}

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, ул. Осиповского, 2 а, Киев, 04123

² Учебно-научный центр «Институт биологии и медицины» Киевского национального университета им. Т. Шевченко, пр. академика Глушкова, 2, Киев, 03022

³ Национальный институт рака, ул. Ломоносова 33/43, Киев, 03022

E-mail: liudmyla_garmanchuk@ukr.net¹, marie0589@gmail.com², yemets.alla@nas.gov.ua³, nkhranovska@ukr.net⁴

*Ранее нами был разработан новый альтернативный подход для внеклеточного синтеза квантовых точек CdS с использованием биологических матриц, полученных на основе бактерии *Escherichia coli*, гриба *Pleurotus ostreatus* и растения *Linaria maroccana*. Полученные наночастицы обладают устойчивыми люминесцентными свойствами и имеют диапазон размеров от 2 до 10 нм в диаметре. В данной работе представлены результаты исследования цитотоксического/цитостатического воздействия, пролиферативной активности, адгезивной способности синтезированных квантовых точек CdS на клетки HeLa (рак шейки матки человека), опухолевые клетки T- и B-лимфоцитов человека, линию опухолевых клеток AGS (рак желудка) с использованием МТТ-теста и проточной цитометрии. Обнаружено, что квантовые точки CdS, полученные методом «зеленого» синтеза, имеют более низкую токсичность по сравнению с неорганическим сульфидом кадмия, что делает их привлекательными в качестве нового типа нетоксичных люминесцентных зондов для био-визуализации в цитологических исследованиях.*

Ключевые слова: квантовые точки, сульфид кадмия, цитотоксичность, опухолевые клетки, пролиферативная активность, адгезивная способность.

Введение. Квантовые точки представляют собой люминесцентные полупроводниковые частицы, которые могут быть использованы в качестве новых флуоресцентных зондов [1]. По сравнению с обычными органическими красителями квантовые точки обладают уникальными фотофизическими свойствами: настраиваемое по яркости свечение, интенсивность флуоресценции, устойчивость к фотообесцвечиванию и одновременное возбуждение

нескольких цветов флуоресценции. Кроме того, квантовые точки получают для различных биологических применений, включая иммуногистохимическое детектирование, доставку лекарств и терапию, визуализацию и отслеживание одиночных молекул [2, 3].

Среди различных полупроводниковых материалов квантовые точки CdS являются наиболее важной группой полупроводников II–VI групп, которые детально изучены из-за их, зависящей от размера, фотолюминесценции, перестраиваемой по видимому спектру. Фактически, основной интерес к изучению квантовых точек CdS связан с их фотолюминесцентными свойствами, которые делают их пригодными для биологических и биомедицинских исследований [4].

Получение квантовых точек CdS проводится с использованием различных химических методов, а именно: микроволновый нагрев, микроэмульсионный синтез и ультразвуковое облучение [5,6]. Однако, химические методы требуют дорогостоящих установок, высокотоксичных реактивов и в результате производят большое количество токсичных отходов, загрязняющих окружающую среду. Поэтому альтернативный подход предполагает использование биологических систем для синтеза наноматериалов [7]. Живые организмы обладают уникальным потенциалом для получения наночастиц различной формы и размеров. В частности, нами ранее успешно внеклеточно синтезированы наночастицы сульфида кадмия с использованием в качестве матриц различных живых организмов, а именно – бактерии, грибы и растения [8–12]. Культуры клеток, используемые для синтеза наночастиц, легко выращивать в лабораторных условиях, они без-

© Л.В. ГАРМАНЧУК, М.Н. БОРОВАЯ, А.А. НЕГЕЛЯ,
М. ИНОМИСТОВА, Н.Н. ХРАНОВСКАЯ,
А.Н. ТОЛСТАНОВА, Я.Б. БЛЮМ, А.И. ЕМЕЦ, 2019

опасны для окружающей среды и продуцируют в короткий срок большое количество биомассы.

Однако вопрос цитотоксичности квантовых точек имеет важное значение для их последующего практического использования. Известно, что токсичность квантовых точек определяется их физико-химическими параметрами: размером, зарядом, стабильностью, а также химическим составом. Поэтому необходимо тщательное тестирование квантовых точек CdS, полученных методом «зеленого» синтеза, относительно их токсического воздействия на различные типы клеток для возможности их дальнейшего биологического и биомедицинского применения.

Исходя из этого целью данного исследования была оценка возможного цитотоксического эффекта полупроводниковых наночастиц CdS, которые были синтезированы нами ранее [8–12]. Оценка цитотоксического/цитостатического действия, пролиферативной активности и адгезионных свойств проводилась с использованием клеток HeLa (рак шейки матки человека), трансформированных Т- и В-лимфоцитов человека и линии опухолевых клеток AGS (рак желудка). Цитотоксичность синтезированных наночастиц и жизнеспособность клеток исследовали с помощью МТТ-анализа и проточной цитофлуориметрии. Было сопоставлено токсическое воздействие наночастиц CdS, полученных с использованием различных биологических матриц, с потенциальной токсичностью неорганического сульфида кадмия.

Материалы и методы. Методика «зеленого» синтеза квантовых точек CdS, а также их физико-химические свойства подробно описаны в наших предыдущих работах [8–11]. Характеризацию квантовых точек CdS проводили с использованием электронного микроскопа JEM-2100F (Япония) с ускоряющим напряжением 200 кВ. Каждый образец диспергировали ультразвуком для отделения частиц.

Концентрация наночастиц CdS, полученных с использованием бактерии *Escherichia coli* в стоковом растворе, была 3,6 мг/мл; с помощью гриба *Pleurotus ostreatus* – 3,75 мг/мл; с помощью растения *Linaria maroccana* – 1,2 мг/мл. Концентрация соли CdS, полученной без до

Токсичность квантовых точек CdS изучали, используя следующие клеточные линии: трансформированные клетки HeLa (рак шейки матки); клеточная линия Namalwa (лимфома Беркитта); МТ-4 (Т-клеточная лейкемия); клеточная линия AGS (рак желудка).

Инкубирование клеток HeLa проводили в стандартных условиях в термостате при 37 °С, 100%-ной влажности, 5 % CO₂, с использованием питательной среды RPMI («Sigma», США) с добавлением 10%-ной FBS («Sigma», США), 2 mM L-глутамин и 40 мг/мл гентамицина. Т- и В-лимфоциты ресуспендировали в среде (DMEM или RPMI-1640 («Sigma», США), с добавлением 10–15 % FBS («Sigma», США). Исследование митогенного воздействия квантовых точек по отношению к опухолевым клеткам проводили в стационарной фазе роста, когда большая часть клеток находилась в фазе G₀ клеточного цикла. Лимфоциты выделяли из периферической крови здоровых доноров путем центрифугирования в градиенте фиколл-верографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$) при 1000 g, в течение 40 мин. Лимфоциты в концентрации 1×10^6 /мл инкубировали на протяжении 3 дней при 37 °С, 5 % CO₂ на питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10 % FBS, 200 мкМ/л L-глутамин; 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Цитотоксическое/цитостатическое действие CdS, их влияние на пролиферативную активность, и жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-колориметрического метода [13]. Метод основан на способности митохондриальных ферментов живых клеток трансформировать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетра-золиумбромид (МТТ) – желтую соль в нерастворимый формазан фиолетового цвета. С этой целью 20 мкл раствора МТТ («Sigma», США) добавляли в лунки 96-луночных планшетов и инкубировали с клетками на протяжении 3 ч. После центрифугирования (1500 об/мин) удаляли супернатант. Затем 100 мкл диметилсульфоксида («Sigma», США) добавляли в каждую лунку для растворения кристаллов формазана. Оптическое поглощение измеряли с помощью спектрофотометра (длина волны 540 нм).

Токсичность квантовых точек CdS также изучали, используя цитофлуориметрический ана-

лиз. Известно, что клетки в фазе $G_2 + M$ содержат удвоенное количество ДНК и флуорохрома соответственно по сравнению с фазой $G_{1/0}$ клеточного цикла. Количество ДНК в S-фазе постепенно увеличивается, что фиксируется прибором. Число импульсов на канал регистрируется на оси ординат: чем выше кривая в любой точке, тем больше клеток с соответствующим содержанием ДНК в этом канале. ДНК исследуемых клеток окрашивали пропидий иодидом (PI) — флуоресцентным красителем, который избирательно связывается с интеркалирующими сайтами в ДНК. Плотность клеток в образце составляла 10^6 . Чтобы оценить пропорциональное количество клеток в разных фазах клеточного цикла ($G_{1/0}$, S, $G_2 + M$) были построены гистограммы распределения с использованием математических программ ModFit LT 2.0 («BDIS», США). Для измерения флуоресценции PI использовали узкополосный фильтр 585/42 нм.

Адгезионные свойства определяли по количеству (в %) прикрепленных клеток, окрашенных кристаллическим фиолетовым. Для этого исследованные клетки обрабатывали квантовыми точками CdS и положительным контролем — биологическими матрицами, используемые для синтеза квантовых точек CdS в 96-луночных планшетах в течение 48 часов. Далее клетки дважды промывали в PBS-буфере и фиксировали прикрепленные клетки в растворе 70%-ного этанола. После этого образцы окрашивали кристаллическим фиолетовым в течение 15–30 мин, затем трижды промывали в PBS-буфере. Краситель растворяли в диметилсульфоксиде, оптическое поглощение измеряли на длине волны 570 нм.

Для определения выживаемости клеток HeLa под действием наночастиц CdS использовали метод подсчета клеток после окрашивания трипановым синим. Выживаемость клеток определяли как процент живых клеток после обработки наночастицами по сравнению с соответствующим контролем (бактериальная, грибная и растительная матрицы, используемые для синтеза наночастиц).

Люминесцентная микроскопия. Для изучения проникновения и внутриклеточной локализации синтезированных нами наночастиц клетки инкубировали с квантовыми точками CdS

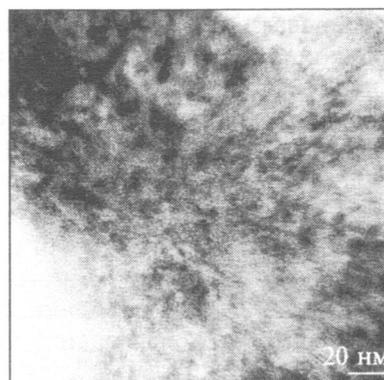


Рис. 1. TEM-микрофотография квантовых точек CdS (*Escherichia coli*)

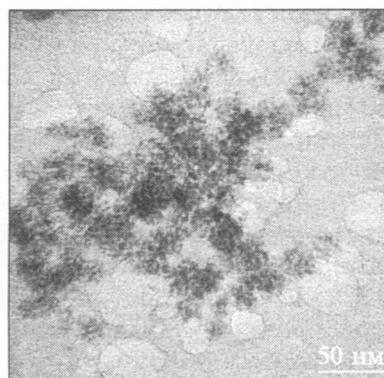


Рис. 2. TEM-микрофотография квантовых точек CdS (*Pleurotus ostreatus*)

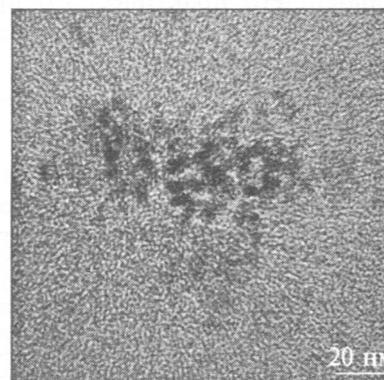


Рис. 3. TEM-микрофотография квантовых точек CdS (*Linaria maroccana*)

на протяжении 48 ч. Для окрашивания клеточных ядер использовали 10 мкл DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола) в фосфатном буферном солевом растворе и глицерине). Об-

разцы анализировали с помощью люминесцентного микроскопа AxioImager M1 «Carl Zeiss» (Германия) с использованием фильтра для FITC и DAPI. Сравнение изображений, полученных с использованием фильтров DAPI и FITC, выполняли с помощью программного обеспечения Isis v 5.3 «Meta Systems» (Германия).

Статистический анализ проводили с использованием стандартного программного обеспечения «Statistica 8.0». Для проверки среднего значения образцов, использовали t-критерий Стьюдента [14].

Результаты исследований и их обсуждение. Характеристика синтезированных квантовых точек CdS с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ). С помощью метода ТЕМ была исследована морфология и кристаллическая структура наночастиц CdS (рис. 1–3). Было показано, что квантовые точки, полученные методом «зеленого» синтеза, имеют сферическую форму, гладкую поверхность и диаметр в пределах 3–8 нм, в зависимости от используемой для их получения биологической матрицы. Полученные наночастицы CdS фильтровали через стерильные фильтры Millipore для проведения дальнейших исследований по цитотоксичности.

Цитотоксическое влияние квантовых точек CdS на клетки HeLa. Оценка цитотоксичности квантовых точек имеет решающее значение для их дальнейшего практического применения в биологических и биомедицинских исследованиях. Для этого, как правило, используют классический МТТ-анализ, позволяющий отобразить метаболическую активность внутри-

клеточных ферментов [15]. В нашем исследовании была проанализирована токсичность трех типов квантовых точек CdS, синтезированных с использованием матриц, полученных на основе бактерии *E.coli*, гриба *P. ostreatus* и растения *L. maroccana*.

Значительный цитостатический эффект продемонстрировали квантовые точки CdS, полученные с использованием в качестве матрицы – *E.coli*. Обработка клеток HeLa этим типом наночастиц приводила к увеличению количества мертвых клеток в 2 и 2,8 раза по сравнению с отрицательным контролем. После обработки квантовыми точками CdS (*E.coli*) апоптотический индекс клеток HeLa составлял 9,5 и 7,5 % в отрицательном контроле (таблица). Квантовые точки CdS, синтезированные с использованием *P. ostreatus* продемонстрировали антипролиферативный эффект – уменьшение количества клеток в сравнении с контролем составило 29,2 %. В то же время наблюдали ингибирование пролиферативной активности опухолевых клеток, обработанных квантовыми точками CdS (*L. maroccana*), по сравнению с интактными клетками HeLa. Были выявлены также апоптотические, цитостатические и цитотоксические эффекты наночастиц. По сравнению с контролем наблюдали 3- и 2-кратное увеличение апоптотического и цитостатического эффекта для CdS (*L. maroccana*). В частности, до 21 % увеличилось количество мертвых клеток после обработки клеток HeLa квантовыми точками CdS (*L. maroccana*), а апоптотический индекс клеток HeLa достигал 17,5 % (таблица).

Цитотоксическое/цитостатическое эффекты, индекс апоптоза и выживаемость клеток HeLa после обработки квантовыми точками CdS

Показатели	Интактные клетки (негативный контроль)	Неорганический CdS (1,8 мг/л)	Квантовые точки CdS (<i>E. coli</i>) (1,8 мг/л)	Квантовые точки CdS (<i>P. ostreatus</i>) (1,8 мг/л)	Квантовые точки CdS (<i>L. maroccana</i>) (0,6 мг/л)
Количество клеток (×105)	2,4	0,1	0,8	1,7	1,9
Изменение количества клеток (%)	—	4 %*	33,3 %*	70,8 %*	79,2 %*
Живые клетки (×105)	2,1	0,02*	0,6*	1,6*	1,5*
Мертвые клетки (×105)	0,3	0,08	0,2	0,1	0,4
Живые : мертвые (%)	91,3 : 8,7	20,0 : 80,0*	75,0 : 25,0	94,1 : 5,9	79,0 : 21,0
Индекс апоптоза (%)	7,5	45,8*	9,5	8,9	17,5*

Примечание. * – $P < 0,05$ относительно контроля.

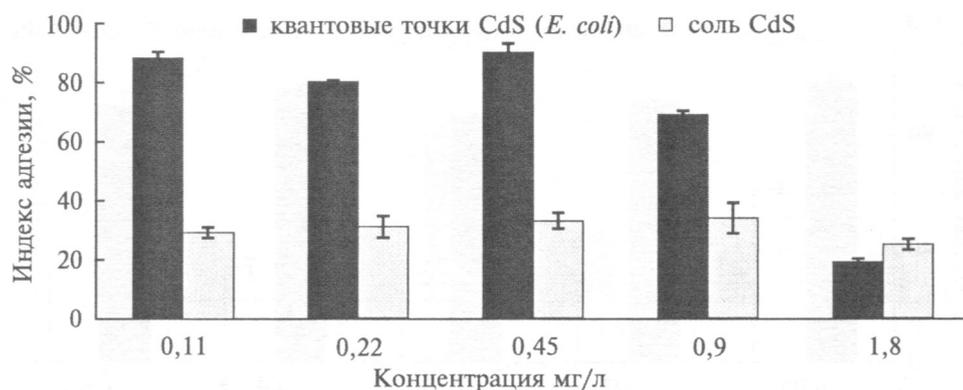


Рис. 4. Адгезионный потенциал клеток HeLa после обработки квантовыми точками CdS (*E. coli*)

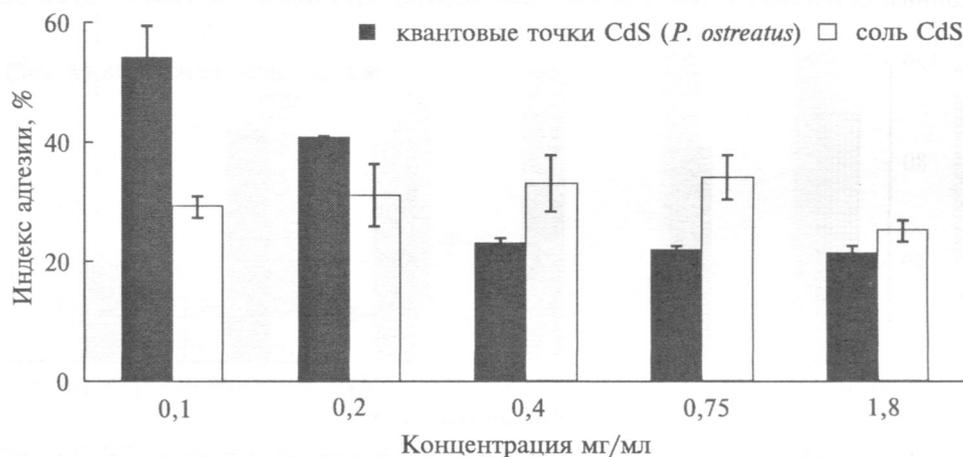


Рис. 5. Адгезионный потенциал клеток HeLa после обработки квантовыми точками CdS (*P. ostreatus*)

Молекулы клеточной адгезии играют значительную роль в прогрессировании рака и метастатическом процессе [16]. Важным показателем функционального состояния раковых клеток является их способность к межклеточной адгезии, которая вызывает врастание в сосудистую систему и развитие метастазов. Снижение адгезионной способности опухолевых клеток, по-видимому, коррелирует со снижением злокачественности опухолевых клеток. В этой связи также изучался адгезионный потенциал клеток HeLa до и после обработки квантовыми точками CdS. Обработка клеток HeLa квантовыми точками, полученными с помощью *E. coli*, в высоких концентрациях (0,9–1,8 мг/л) приводила к снижению адгезионного потенциала клеток, его показатели снижались с 70 до 20 % (рис. 4).

В то время как адгезионный потенциал клеток HeLa, обработанных неорганическим сульфидом кадмия в тех же концентрациях, достигал 30 %. Нами было обнаружено, что квантовые точки CdS, синтезированные с помощью *P. ostreatus*, обладают свойствами, которые значительно уменьшают адгезионный потенциал клеток HeLa по сравнению с неорганическим CdS. Было установлено, что различные концентрации квантовых точек CdS (*P. ostreatus*) от 0,1 до 1,8 мг/л снижают адгезионный потенциал раковых клеток от 55 до 22 %. В то же время такие концентрации неорганического CdS не изменяли существенно адгезионный потенциал клеток HeLa. Значение адгезионного потенциала составляло примерно 29 % и оно снижалось лишь до 25 % при использовании высокой концентрации неорганического CdS (рис.

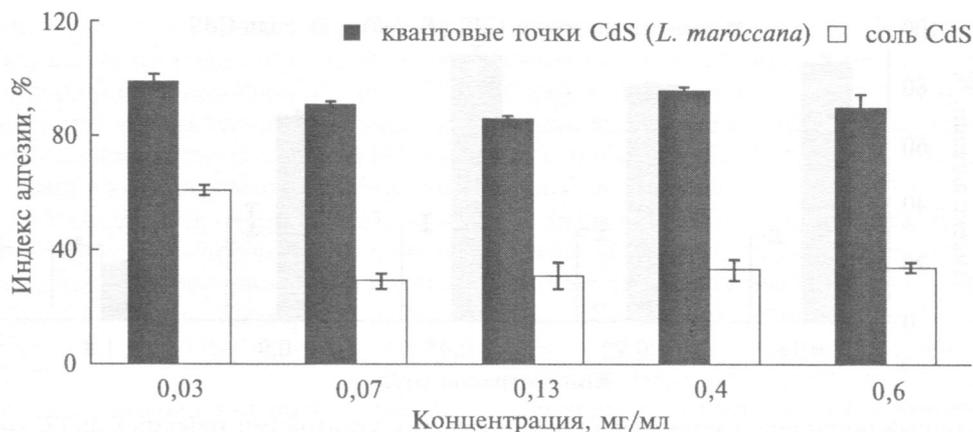


Рис. 6. Адгезионный потенциал клеток HeLa после обработки квантовыми точками CdS (*L. maroccana*)

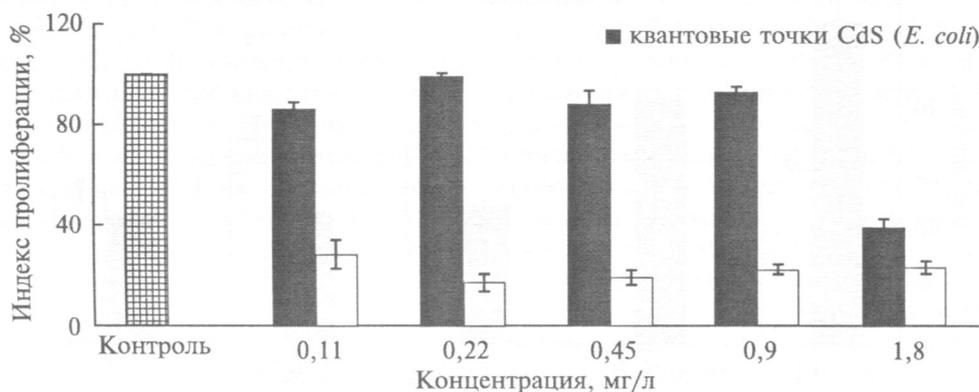


Рис. 7. Уровень пролиферации клеток HeLa после обработки квантовыми точками CdS (*E. coli*)

5). Клетки HeLa после обработки квантовыми точками CdS (*L. maroccana*) в концентрациях от 0,037 до 0,6 мг/л имели тенденцию поддерживать высокий уровень адгезионной способности до 90 % (рис. 6).

На основании полученных результатов можно заключить, что обработка неорганическим сульфидом кадмия снижала адгезионный потенциал клеток HeLa до 25–29 %. Тогда как, обработка квантовыми точками CdS (*E. coli*) и квантовыми точками CdS (*P. ostreatus*) вызвала дозозависимое снижение адгезионного потенциала раковых клеток. В частности, было обнаружено, что увеличение концентрации квантовых точек CdS в образцах приводит к снижению адгезионных свойств клеток HeLa (рис. 4, 5).

Также изучали влияние различных типов квантовых точек CdS, синтезированных нами

ранее с использованием разных биоматриц, на пролиферацию клеток HeLa с помощью МТТ-теста. Было установлено, что пролиферативная активность клеток HeLa после обработки квантовыми точками CdS (*E. coli*) при увеличении их концентраций снижалась с 86 до 40 %. В то время как обработка неорганическим CdS в тех же концентрациях приводила к изменению показателей пролиферации клеток HeLa, пролиферативная активность клеток была на уровне 20–28 % (рис. 7).

Обработка квантовыми точками CdS (*P. ostreatus*) приводила к дозозависимому ингибированию пролиферации раковых клеток. Так, концентрации 0,9–1,8 мг/л квантовых точек (*P. ostreatus*) снижали пролиферацию клеток до 22 %. Обработка неорганическим сульфидом кадмия при этих концентрациях снижала пролиферативную активность клеток до 23–28 % (рис. 8).

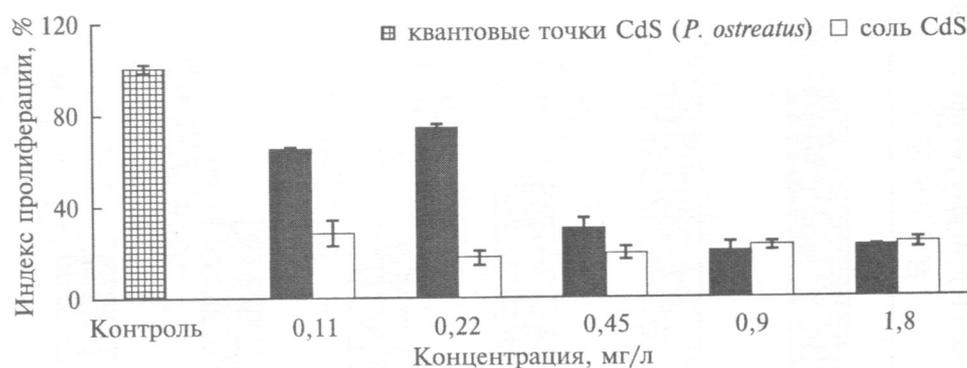


Рис. 8. Уровень пролиферации клеток HeLa после обработки квантовыми точками CdS (*P. ostreatus*)

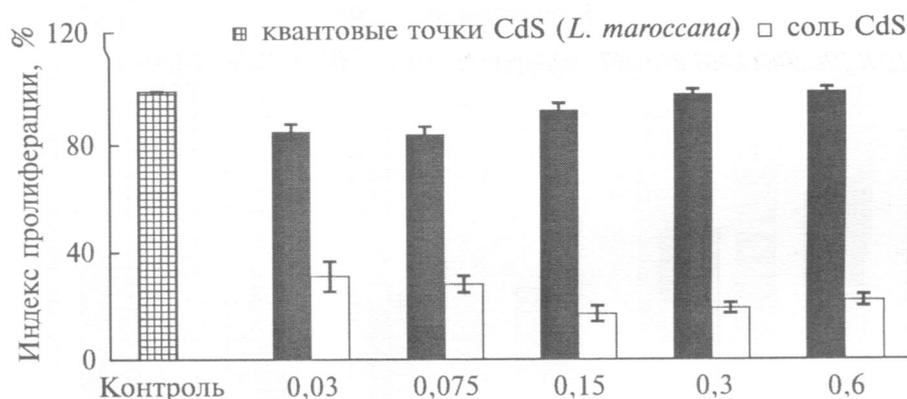


Рис. 9. Уровень пролиферации клеток HeLa после обработки квантовыми точками CdS (*L. maroccana*)

Квантовые точки CdS (*L. maroccana*) в больших концентрациях значительно увеличивали пролиферацию раковых клеток (до 100 %). Воздействие неорганического CdS на клетки HeLa приводило к изменениям пролиферативной активности клеток в диапазоне 22–30 % (рис. 9). Таким образом, наиболее перспективными оказались квантовые точки CdS, синтезированные с помощью *E. coli* и *P. ostreatus*, поскольку они уменьшают адгезионный потенциал клеток HeLa и обладают антипролиферативным эффектом.

Цитотоксичность квантовых точек CdS на трансформированные T- и B-лимфоциты. Потенциальное токсическое влияние квантовых точек на иммунные клетки и их функции остается плохо изученным. Поэтому были исследованы цитотоксические/цитостатические эффекты синтезированных нами квантовых точек CdS (*P. ostreatus*) в сравнении с неорганическим сульфидом кадмия на трансформиро-

ванных T- и B-лимфоцитах человека. Следует отметить, что неорганический CdS оказывает выраженное токсическое воздействие на T-лимфоциты (клеточная линия МТ-4) (рис.10). Согласно результатам МТТ-анализа, было установлено, что уровень ферментативной активности в обработанных клетках постепенно снижался в зависимости от использованных концентраций сульфида кадмия. Обработка T-лимфоцитов неорганическим CdS в концентрациях 0,04–0,3 мг/мл вызывала снижение ферментативной активности и приводила к ингибированию жизнеспособности клеток. Пролиферативная активность клеток при этом снижалась с 70 до 50 %. Также было оценено цитотоксическое/цитостатическое действие квантовых точек CdS (*P. streatus*) на T-лимфоцитах клеточной линии МТ-4, используемых в концентрациях 2,5–5 мг/мл. Нами было установлено, что обработка квантовыми точками приводит к образованию кластеров T-лим-

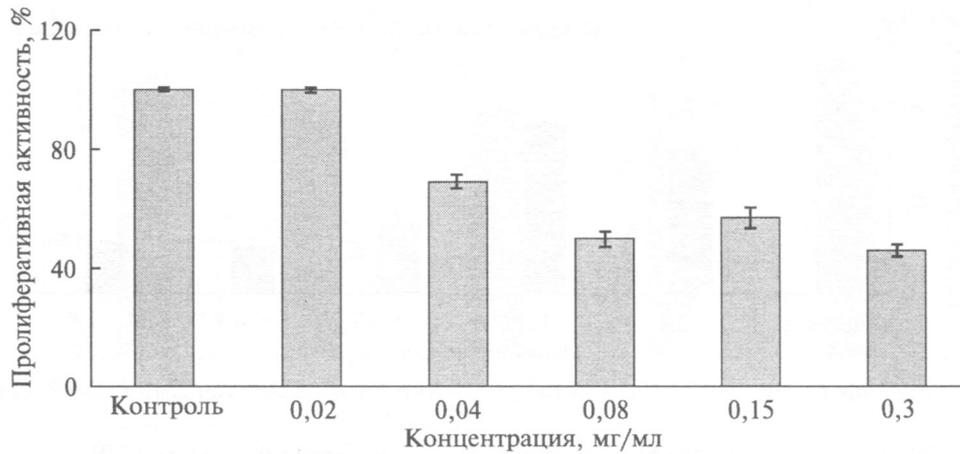


Рис. 10. Результаты цитотоксического влияния неорганического CdS на Т-лимфоциты

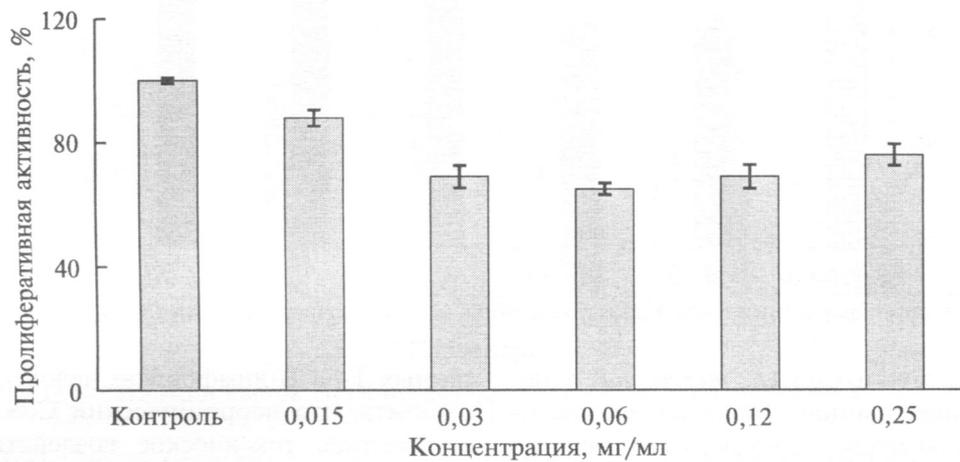


Рис. 11. Результаты цитотоксического влияния квантовых точек CdS на Т-лимфоциты

фоцитов. Индукция апоптоза была обнаружена только при использовании высокой концентрации квантовых точек CdS (1,5 мг/мл).

Обработка клеток квантовыми точками показала, что они менее токсичны, чем неорганический сульфид кадмия (рис. 11). Установлено, что обработка низкими концентрациями (0,015–0,25 мг/мл) незначительно изменяла пролиферативную активность Т-лимфоцитов (с 88 до 70 %). Таким образом, квантовые точки, синтезированные с использованием биологических матриц, не оказывали существенного влияния на жизнеспособность Т-лимфоцитов. Сравнивая с действием неорганического CdS, можно заключить, что он сильно ингибировал пролиферативную активность Т-лимфоцитов,

снижая ее до 50 %, тогда как после обработки квантовыми точками CdS пролиферативная активность клеток составляла 70–90 %.

Также сравнивали воздействие неорганического CdS и синтезированных квантовых точек CdS на цитотоксический/цитостатический и пролиферативный потенциал на опухолевых В-лимфоцитах (фенотип Namalwa). Было обнаружено, что в отличие от Т-лимфоцитов, неорганические ионы кадмия проявляют сильный митогенный эффект на В-лимфоциты. На рис. 12 показано влияние 0,01–0,3 мг/мл CdS на индукцию клеточной пролиферации В-лимфоцитов.

Следует отметить, что обработка В-лимфоцитов неорганическим кадмием во всем диа-

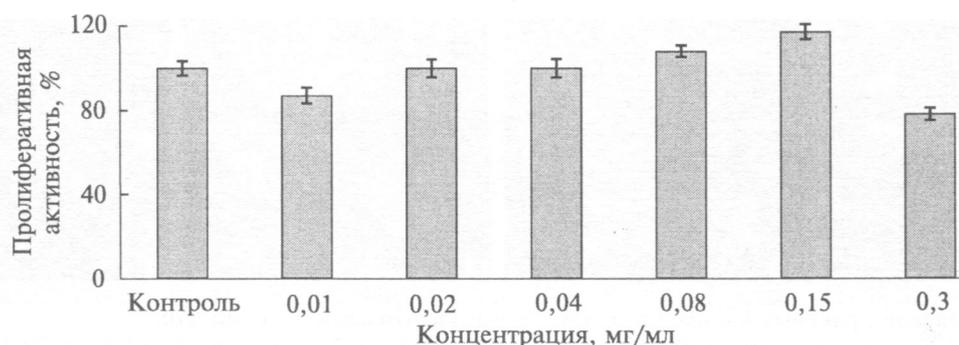


Рис. 12. Результаты цитотоксического влияния CdS на В-лимфоциты

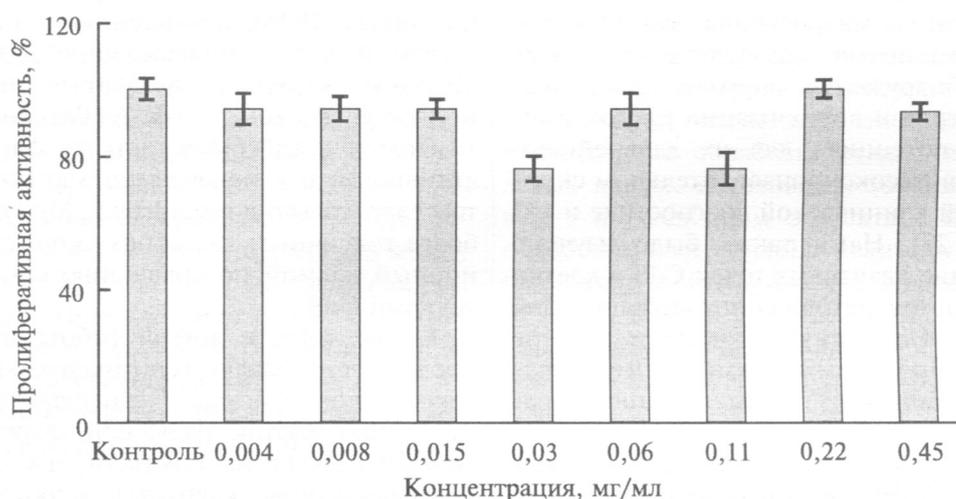


Рис. 13. Результаты цитотоксического влияния квантовых точек CdS на В-лимфоциты

пазоне тестируемых концентраций приводила к увеличению пролиферативной активности клеток и составляла 78–108 % по сравнению с интактными клетками. Ранее было установлено, что кадмий оказывает множественные эффекты на иммунную систему. В частности, кадмий может усиливать моноцитарную дифференциацию ERK1/2, что приводит к увеличению генерации функциональных моноцитов [17]. Кроме того, Cd²⁺ при низких микромолярных концентрациях стимулирует рост клеток и индуцирует некоторые протоонкогены в некоторых клеточных линиях млекопитающих [18]. Исходя из этого, можно предположить, что неорганические ионы кадмия вызывали стимулирующее действие на В-лимфоциты, в отличие от Т-лимфоцитов.

Что касается влияния квантовых точек CdS, полученных с помощью *P. ostreatus*, на В-лим-

фоциты, то нами установлено, что обработка квантовыми точками в концентрациях 0,04–0,45 мг/мл не приводит к уменьшению активности пролиферации клеток (этот показатель приблизительно был на уровне 90 %). Цитотоксический эффект также не был обнаружен, поскольку пролиферативная активность клеток находилась в пределах от 76 до 94 % (рис. 13).

По результатам МТТ-теста достоверного снижения ферментативной активности опухолевых клеток не наблюдали. Обработка более высокими концентрациями квантовых точек, а именно 0,45 мг/мл, также не приводила к ингибированию пролиферацию В-лимфоцитов. Пролиферативная активность составляла примерно 90 %. Эти результаты сопоставимы с данными, полученными при изучении влияния квантовых точек CdS на Т-лимфоциты,

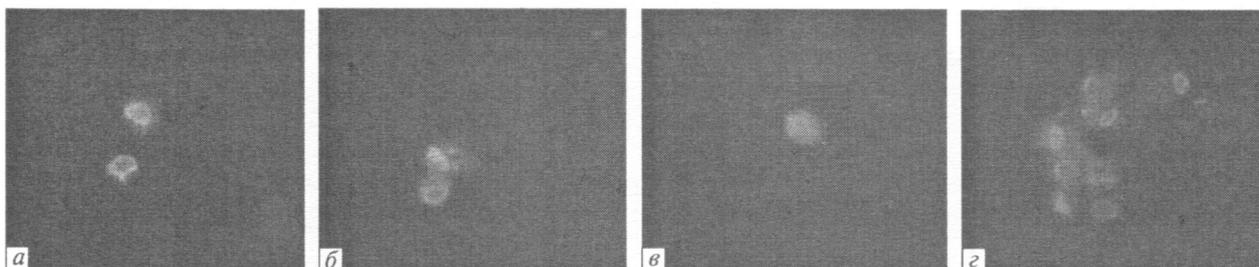


Рис. 14. Визуализация раковых клеток после обработки квантовыми точками CdS

в этом случае пролиферативная активность также была 70–90 %.

Флуоресцентная микроскопия квантовых точек CdS. Успешное использование квантовых точек для обнаружения опухолеспецифических биомаркеров и визуализации клеток имеет большой потенциал для их дальнейшего применения в высокопроизводительном скрининге, ранней клинической диагностике и хирургии [26, 27]. Нами также было изучено проникновение квантовых точек CdS в клетки HeLa и их внутриклеточная локализация. Для этого клетки HeLa инкубировали в течение 48 ч с синтезированными квантовыми точками CdS (*P. ostreatus*), взятых в концентрации 0,1–0,5 мг/мл. Для окрашивания ядер использовали селективно связывающий ДНК флуорохром DAPI. Было обнаружено, что квантовые точки CdS легко проникают в клетки и флуоресцируют в зеленом спектральном диапазоне в цитоплазме (рис. 14).

Также нами было исследовано морфологическое изменение клеток HeLa и AGS после обработки неорганическим кадмием и квантовыми точками CdS (*P. ostreatus*). Было обнаружено сильное токсическое влияние неорганических ионов кадмия по сравнению с наночастицами CdS (рис. 15). Обработка квантовыми точками опухолевых клеток приводила к небольшой агрегации клеток, но не к изменению их формы и структуры. Ранее было установлено, что токсичность квантовых точек CdS может быть связана с высвобождением ионов свободного кадмия [19]. В работе [20] авторы исследовали цитотоксичность химически синтезированных квантовых точек CdS в изолированных гемоцитах и жаберных клетках мидии *Mytilus galloprovincialis*. Обработка клеток *M. galloprovincialis* квантовыми точками

в сублетальных концентрациях (0,31–5 мг/л) приводила к образованию реактивных форм кислорода (ROS), повышению активности каталазы (CAT), к повреждению ДНК, к увеличению активности фосфатазы лизосомальной кислоты (AcP), Na-K-АТФазной активности (только в жаберных клетках), фагоцитарной активности и к повреждению актинового цитоскелета (только в гемоцитах) [20]. Однако наиболее токсичным для обоих типов клеток был ионный кадмий по сравнению с квантовыми точками CdS.

Кроме того, в другой работе было четко продемонстрировано генотоксическое и цитотоксическое действие квантовых точек CdS на линию клеток радужной форели. Полученные результаты показали, что химически синтезированные квантовые точки имеют высокую цитотоксичность в концентрациях 10 и 50 мкг/мл и проявляют зависимость от концентрации генотоксичность в субтоксическом диапазоне (0,01–1 мкг/мл) после 24-часовой обработки [21]. Такие концентрации значительно меньше, чем те, которые были исследованы в настоящей работе. В нескольких исследованиях было высказано предположение, что цитотоксические эффекты квантовых точек могут быть опосредованы ионами кадмия, высвобождаемыми из ядра квантовой точки, и, как следствие, дисбалансом внутриклеточного окислительного статуса [22, 23].

Также было изучено токсическое действие химически синтезированных наночастиц CdS на клетки *E. coli* и HeLa [24]. Жизнеспособность клеток HeLa снижалась с увеличением концентрации наночастиц CdS, и значение IC50 для них было 4 мкг/мл. Обработанные клетки HeLa, как было показано, имели измененную морфологию, также конденсиро-

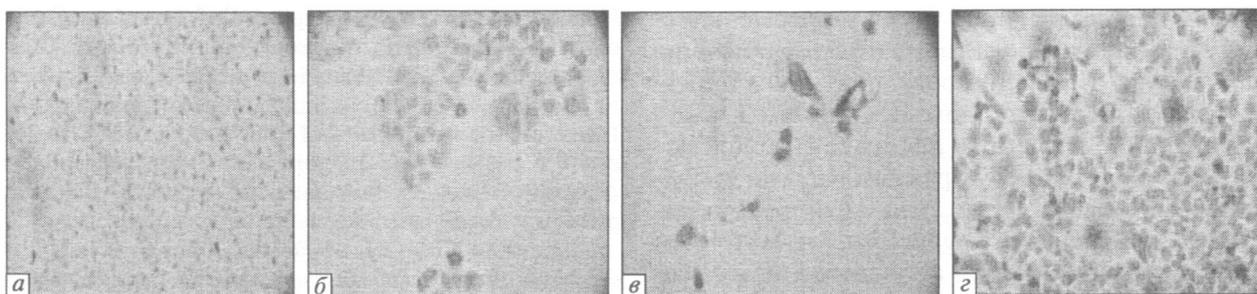


Рис. 15. Морфологические особенности клеток HeLa (а, б) и AGS клеток (в, з) обработанных квантовыми точками CdS и неорганическим CdS. а, в – обработка неорганическим CdS; б, з – обработка квантовыми точками CDS (*P. ostreatus*). Концентрация квантовых точек – 0,45 мг/мл

ванные и фрагментированные ядра. Концентрация 2,5 мкг/мл была использована для изучения токсических воздействий наночастиц CdS на жизнеспособность клеток и было обнаружено, что жизнеспособность клеток снижается с увеличением продолжительности обработки. Противоположная корреляция между уменьшением роста клеток и повышенным уровнем ROS свидетельствует о том, что окислительный стресс может быть составляющей частью пути, посредством которого наночастицы CdS индуцируют цитотоксичность как в прокариотических, так и в эукариотических клетках [24].

Таким образом, химически синтезированные наночастицы CdS проявляют цитотоксическое действие на живые клетки при концентрациях, которые значительно меньше, чем мы использовали в нашем исследовании. Продемонстрировано, что токсичность ионов кадмия значительно уменьшается за счет экранирования поверхности наночастиц органическими молекулами [25]. Защитный слой вокруг квантовой точки, образованный белками, ферментами, вторичными метаболитами или другими молекулами, которые являются неотъемлемой частью процесса синтеза с использованием биологических матриц, может препятствовать высвобождению ионов кадмия, что значительно снижает их токсичность. Важно отметить, что наши предыдущие исследования также подтвердили, что квантовые точки CdS, синтезированные с использованием *E.coli* и *P. ostreatus*, в концентрации 0,45 мг/мл, не оказывали значительного отрицательного воздей-

ствия *in vivo* и не проявляли генотоксического эффекта на *Drosophila melanogaster* [26].

Суммируя полученные данные, можно заключить, что обработка разных типов опухолевых клеток квантовыми точками CdS приводит к различным эффектам. В частности, обработка клеток HeLa квантовыми точками приводила к снижению пролиферации клеток, за исключением CdS (*L. maroccana*), которые напротив увеличивали пролиферативную активность клеток HeLa. Обработка Т- и В-лимфоцитов квантовыми точками, синтезированными с использованием *P. ostreatus*, приводила к повышению уровня пролиферативной активности клеток (70–90 %) по сравнению с неорганическим CdS, который ингибировал жизнеспособности клеток до 30 % (клетки HeLa), 50 % (Т-лимфоциты), а также стимулировал клеточную пролиферацию до 108 % у В-лимфоцитов. Было установлено, что квантовые точки существенно не изменяют морфологию опухолевых клеток. Высокая яркость квантовых точек, настраиваемый по размеру узкий пик люминесценции отличают их от обычных флуоресцентных красителей. Из-за упомянутых свойств и низкой цитотоксичности квантовые точки CdS можно рассматривать в качестве перспективных флуоресцентных зондов для визуализации и маркировки внутриклеточных молекул, структур, а также самих клеток.

Выводы. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что квантовые точки CdS, синтезированные с использованием с использованием разных биологических матриц (бактериальной, грибной, растительной), оказыва-

ют различное влияние на опухолевые клетки. Механизмы и факторы, контролирующие накопление и токсичность полупроводниковых наноматериалов, довольно сложны и будут подробно изучены в наших следующих исследованиях. Однако в рамках настоящей работы было установлено, что антипролиферативная активность присуща квантовым точкам CdS, синтезированным с использованием *E. coli* и *P. ostreatus*. Эти наночастицы также снижали адгезионные свойства раковых клеток дозозависимым образом. Квантовые точки, синтезированные с использованием *L. maroccana*, наоборот, увеличивали пролиферативную активность и адгезионные свойства опухолевых клеток соответственно. Неорганический кадмий проявлял намного большую токсичность по сравнению со всеми тремя типами тестируемых квантовых точек CdS. Обработка квантовыми точками иммунных клеток приводило к повышению уровня пролиферации лимфоцитов. Наночастицы CdS не вызывали каких-либо морфологических изменений в исследуемых клетках. Также нами также было показано, что квантовые точки способны легко проникать внутрь клеток, локализуясь преимущественно в цитоплазме, обладают высокой яркостью и фотостабильностью. Таким образом, синтезированные с помощью биоматриц полупроводниковые квантовые точки CdS могут в дальнейшем быть функционализированы и потенциально использоваться в качестве нетоксичных флуоресцентных зондов для различного рода биологических и биомедицинских исследований.

DIFFERENTLY GREEN-SYNTHESIZED CdS QUANTUM DOTS: COMPARISON OF TOXICITY, ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS AND ADHESION ACTIVITY ON HUMAN CELLS

L.V. Garmanchuk, A.O. Nehelia, M. Inomistova, N.M. Khranovska, G.M. Tolstanova, Ya.B. Blume, A.I. Yemets

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine Osypovskogo Street, 2 a Educational and Scientific Centre «Institute of Biology and Medicine», Taras Shevchenko National University of Kyiv, Glushkova Avenue 2 National Cancer Institute, Lomonosova Street 33/43 E-mail: liudmyla_garmanchuk@ukr.net, marie0589@gmail.com, yemets.alla@nas.gov.ua, nkhranovska@ukr.net

Quantum dots (QDs) are typical II–VI semiconductor materials, owing to their unique optical properties and tunable photoluminescence, have received much interest in the field of electronic and biomedical applications. However, the cytotoxicity of QDs has become a major concern for their safe usage in bioimaging, intracellular delivery or tracking molecules and organells. We have previously developed a novel alternative approach for the production of CdS QDs extracellularly by the biological synthesis using bacteria *Escherichia coli*, fungi *Pleurotus ostreatus* and plant *Linaria maroccana* as biomatrices. Produced nanoparticles are stable and luminescent, have a range of sizes from 2 to 10 nm in diameter. In the present research we have evaluated cytotoxic/cytostatic effects, proliferative activity, adhesive potential of produced CdS nanoparticles using HeLa cells, tumor cells of human T- and B-lymphocytes, AGS cancer cell line by MTT-assay and flow cytometry methods. It has been found that QDs have reduced toxicity as compared to inorganic cadmium sulfide which makes them attractive as a new type of non-toxic luminescent probes for bioimaging applications in cytological studies.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhao M.X., Zeng E.Z., Application of functional quantum dot nanoparticles as fluorescence probes in cell labeling and tumor diagnostic imaging, *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, vol. 10, pp. 1–9. doi: 10.1186/s11671-015-0873-8.
2. Rosentha, S.J., Chang, J.C., Kovtun, O., McBride, J.R., and Tomlinson, I.D., Biocompatible quantum dots for biological applications, *Chem. Biol.*, 2011, vol. 18, no. 1, pp. 10–24. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.11.013.
3. Medintz, I.L., Mattoussi, H., and Clapp, A.R., Potential clinical applications of quantum dots, *Int. J. Nanomed.*, 2008, vol. 3, no. 2, pp. 151–67.
4. Hoshino, A., Fujioka, K., Oku, T., Nakamura, S., Suga, M., Yamaguchi, Y., Suzuki, K., Yasuhara, M., and Yamamoto, K., Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells, *Microbiol. Immunol.*, 2004, vol. 48, no. 12, pp. 985–94.
5. Tamašauskaitė-Tamašiūnaitė, L., Grincienė, G., Šimkūnaitė-Stanyrienė, B., Naruškevičius, L., Pakštas, V., Selskis, A., and Norkus, E., Preparation of CdS nanoparticles by microwave-assisted synthesis, *Chemija*, 2015, vol. 26, no. 3, pp. 193–197.
6. Wang, G.Z., Chen, W., Liang, C.H., Wang, Y.W., Meng, G.W., and Zhang, L.D., Preparation and characterization of CdS nanoparticles by ultrasonic irradiation, *Inorg. Chem. Commun.*, 2001, vol. 4, no. 4, pp. 208–10.
7. Marchiol, L., Synthesis of metal nanoparticles in living plants, *Ital. J. Agron.*, 2012, vol. 7, no. 3, pp. 274–82. doi: org/10.4081/ija.2012.e37.

8. Borovaya, M.N., Naumenko, A.P., Matvieieva, N.A., Blume, Y.B., and Yemets, A.I., Biosynthesis of luminescent CdS quantum dots using plant hairy root culture, *Nanoscale Res. Lett.*, 2014, vol. 9, pp. 1–7. doi: 10.1186/1556-276X-9-686.
9. Borovaya, M.N., Naumenko, A.P., Yemets, A.I., and Blume, Y.B., Stability of the CdS quantum dots, synthesized by the bacteria *Escherichia coli*, *Reports Nat. Acad. Sci. Ukraine*, 2014, vol. 7, pp. 145–51 (in Ukrainian).
10. Borovaya, M.N., Naumenko, A.P., Pirko, Y.V., Krupodorova, T.A., Yemets, A.I., and Blume, Y.B., Production of CdS quantum dots with the use of the fungus *Pleurotus ostreatus*, *Reports Nat. Acad. Sci. Ukraine*, 2014, vol. 2, pp. 153–9 (in Ukrainian).
11. Borovaya, M., Pirko, Y., Krupodorova, T., Naumenko, A., Blume, Y., and Yemets, A., Biosynthesis of cadmium sulphide quantum dots by using *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, *Biotechnol. Biotechn. Equipm.*, 2015, vol. 29, no. 6, pp. 1156–63. doi: 10.1080/13102818.2015.1064264.
12. Borovaya, M.N., Burlaka, O.M., Naumenko, A.P., Blume, Ya.B., and Yemets, A.I., Extracellular synthesis of luminescent CdS quantum dots using plant cell culture, *Nanoscale Res. Lett.*, 2016, vol. 11, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1186/s11671-016-1314-z.
13. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays, *J. Immun. Meth.*, 1983, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63.
14. McDonald, J.H., Handbook of biological statistics. Sparky House Publishing Baltimore, Maryland, 2008, 293 p.
15. Kong, B., Seog, J.H., Graham, L.M., and Lee, S.B., Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles, *Nanomedicine*, 2011, vol. 6, pp. 929–41. doi: 10.2217/nmm.11.77.
16. Bendas, G., Borsig, L., Cancer cell adhesion and metastasis: selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins, *Int. J. Cell Biol.*, 2012; vol. 2012, pp. 10. doi: 10.1155/2012/676731.
17. Goo, S., Choi, Y.J., Lee, Y., Lee, S., and Chung, H.W., Selective effects of curcumin on CdSe/ZnS quantum-dot-induced phototoxicity using UVA irradiation in normal human lymphocytes and leukemia cells, *Toxicol. Res.*, 2013, vol. 29, no. 1, pp. 35–42. doi: 10.5487/TR.2013.29.1.035.
18. Ober-Blobaum, J.L., Engelhardt, G., Hebel, S., Rink, L., and Haase, H., Cadmium ions promote monocytic differentiation of human leukemia HL-60 cells treated with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, *Biol. Chem.*, 2010, vol. 391, no. 11, pp. 1295–303. doi: 10.1515/BC.2010.135.
19. Zhou, J., Yang, Y., and Zhang, C., Toward biocompatible semiconductor quantum dots: from biosynthesis and bioconjugation to biomedical application, *Chem. Rev.*, 2015, vol. 115, no. 21, pp. 11669–717. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00049.
20. Katsumiti, A., Gilliland, D., Arostegui, I., and Cajaraville, M.P., Cytotoxicity and cellular mechanisms involved in the toxicity of CdS quantum dots in hemocytes and gill cells of the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Aquat. Toxicol.*, 2014, vol. 153, pp. 39–52. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.02.003.
21. Munari, M., Sturve, J., Frenzilli, G., Sandersd, M.B., Brunelli, A., Marcomini, A., Nigroc, M., and Lyons, B.P., Genotoxic effects of CdS quantum dots and Ag₂S nanoparticles in fish cell lines (RTG-2), *Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 2014, vol. 775–776, pp. 89–93. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.09.003.
22. Cho, S.J., Maysinger, D., Jain, M., Ruder, B., Hackbarth, S., and Winnik, F.M., Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells, *Langmuir*, 2007, vol. 23, no. 4, pp. 1974–80. doi: 10.1021/la060093j.
23. Li, K.G., Chen, J.T., Bai, S.S., Wen, X., Song, S.Y., Yu, Q., Li J., and Wang, Y.Q. Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulphide quantum dots, *Toxicol. In Vitro*, 2009; vol. 23, no. 6, pp. 1007–13. doi: 10.1016/j.tiv.2009.06.020.
24. Hossain, Sk.T., Mukherjee, S.K., Toxicity of cadmium sulfide (CdS) nanoparticles against *Escherichia coli* and HeLa cells, *J. Hazard. Mater.* 2013, vol. 260, 1073–82. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.07.005.
25. Galeone, A., Vecchio, G., Malvindi, M.A., Brunetti, V., Cingolani, R., and Pompa, P.P., *In vivo* assessment of CdSe-ZnS quantum dots: coating dependent bioaccumulation and genotoxicity, *Nanoscale*, 2012, vol. 4, no. 2, pp. 6401–7. doi: 10.1039/c2nr31826a.
26. Protsenko, O.V., Dudka, O.A., Kozeretskaya, I.A., Inomystova, M.V., Borovaya, M.N., Pirko, Ya.V., Tolstanova, A.N., Ostapchenko, L.I., and Yemets, A.I. Estimation of toxicity and genotoxicity of CdS quantum dots synthesized with the help of biological matrices, *Proc. Nat. Acad. Sci. Ukraine*. 2016, vol. 4, pp. 111–7.
27. Borovaya, M.N., Burlaka, O.M., Yemets, A.I., and Blume, Ya.B., Biosynthesis of Quantum Dots and Their Potential Applications in Biology and Biomedicine, *Springer International Publishing Switzerland*, 2015, vol. 167, no. 24, pp. 339–62. doi: 10.1007/978-3-319-18543-9_24.

Поступила в редакцию 12.11.18
 После доработки 15.12.18
 Принята к публикации 18.03.19