

УДК 576.3.085.23:577.325

НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЕВРОПИЯ КАК ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ МЕТКИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

*Е. В. Павлович*Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков*E-mail: lenapavlovich@gmail.com*

Получено 14.10.2013

Исследовали морфофункциональные характеристики клеток в культурах в присутствии наночастиц Eu_2O_3 и особенности их люминесценции в клетках, а также возможное токсическое действие в диапазоне концентраций 6,8–340 мкг/мл на культуру клеток эмбриона свиньи и фибробласты человека в суспензии. Методом конфокальной сканирующей микроскопии определяли локализацию наночастиц Eu_2O_3 в клетках фибробластов и перевиваемой линии клеток эмбриона почки свиньи.

Установлено, что наночастицы оксида европия в концентрации 6,8 мкг/мл не оказывают токсического действия на клеточные культуры, люминесцируют в видимой области спектра и длительное время сохраняются в клетках без существенного падения интенсивности свечения. С помощью конфокальной сканирующей микроскопии показано, что наночастицы не проникают в ядро клетки и локализованы в цитоплазме. Их можно применять в качестве нанолюминофоров для мечения суспензий и клеточных культур.

Ключевые слова: клеточная линия СПЭВ, фибробласты, наночастицы, люминофоры.

Применение нанотехнологии в биологии и медицине предполагает тщательное изучение особенностей поведения нанолюминофоров в биосистемах [1–3]. Для них характерна поверхность с высокой концентрацией поверхностных атомов и дефектов на многочисленных границах наночастиц (НЧ), дополнительное рассеяние носителей заряда на границах и появление новых оптических переходов. Указанные особенности проявляются в зависимости выхода люминесценции от размеров НЧ. Отмечено повышение вероятности рекомбинаций носителей заряда внутри НЧ и уменьшение количества безызлучательных переходов, что в ряде случаев приводит к повышению интенсивности люминесценции. Применение НЧ с ионами редкоземельных металлов открывает новые возможности мечения и отслеживания функционального состояния клеточных культур. Эти НЧ обладают уникальными оптическими свойствами и биосовместимостью [1].

Целью работы было изучение жизнеспособности и морфофункциональных характеристик клеток в культурах в присутствии НЧ Eu_2O_3 и их люминесценции в клетках.

Материалы и методы

Перевиваемую линию клеток эмбриона почки свиньи (СПЭВ) и фибробласты человека (ФЧ) культивировали в среде DMEM (Sigma, США) с 5% FCS (v / v) производства HyClone с добавлением пенициллина/стрептомицина и амфотерицина В (5 мкг/мл, РАА, Австрия) в соответствии с методом [4]. Клеточную концентрацию определяли в камере Горяева общепринятым способом [5]. Посевная концентрация составляла $5 \cdot 10^4$ кл/см². Клетки выращивали в условиях стерильного боксового помещения в инкубаторе Sanyo при $t +37$ °С с 5% -м содержанием CO_2 во влажной атмосфере. Пассажи проводили после достижения культурой 100% -го конфлюэнта. Среду культивирования сменяли каждые вторые сутки. Жизнеспособность клеток устанавливали методом суправитального окрашивания трипановым синим [5].

НЧ оксида европия, полученные методом «горячих растворителей» [6] были предоставлены Институтом сцинтилляционных материалов ГНУ НТК «Институт монокристаллов» НАНУ. За основу метода синтеза было взято прямое осаждение оксида редкоземельного элемента в высококипящих мно-

гоатомных спиртах, например в диэтиленгликоле (2,2'-дигироксидиэтиловый эфир — $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $T_{\text{кип}} = 245,8 \text{ }^\circ\text{C}$). Коллоидный раствор НЧ оксида европия готовили путем смешивания хлорида европия $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 0,1$ моль/л), дистиллированной воды ($c = 1$ моль/л), натрия гидроксида NaOH ($c = 0,1$ моль/л) в диэтиленгликоле. Для уменьшения размера наночастиц и дисперсии был применен нагрев с помощью волн СВЧ-диапазона. Раствор НЧ хранили в условиях гипотермии без доступа света в течение менее 3 мес. Этот подход позволил получить прозрачные коллоидные растворы НЧ Eu_2O_3 с меньшим размером и дисперсией (18 ± 2 нм) (рис. 1).

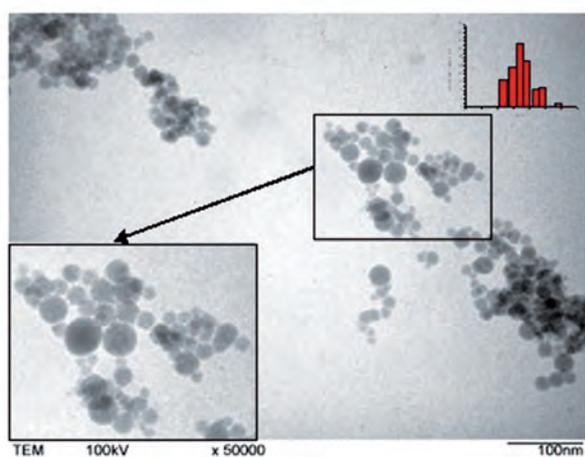


Рис. 1. Электронно-микроскопический снимок наночастиц Eu_2O_3 , синтезированных с применением микроволнового нагрева

Концентрация базового раствора составляла $3,4$ мг/мл. Для опытов использовали раствор НЧ после озвучивания с помощью ультразвукового прибора Mini Ultrasonic cleaner, 220 V, 50 Гц, в течение 30 мин при мощности 50 W непосредственно перед введением в клетки СПЭВ.

Для перевода клеток в суспензионное состояние культуру в состоянии монослоя обрабатывали смесью $0,02\%$ -го раствора Версена и $0,25\%$ -го раствора трипсина (оба: ГУП ИПВЕ им. М. П. Чумакова РАМН) в соотношении $4:1$. НЧ вводили в клеточную суспензию пассивной диффузией, инкубируя при $37 \text{ }^\circ\text{C}$. О длительности сохранения люминесценции НЧ Eu_2O_3 после введения в клетку судили по свечению НЧ в культурах клеток в течение 10 сут [7, 8]. По достижении состояния конфлюэнта клетки пересеивали в посевной концентрации $5 \cdot 10^4$ кл./ 1 см^2 .

Наличие, степень окрашивания клеток и локализацию НЧ оценивали методом кон-

фокальной сканирующей микроскопии (Carl Zeiss LSM 510 Meta, Германия) при длине волны возбуждения 405 нм [9].

Обработку полученных данных осуществляли с помощью программы LSM Image Examiner и AxioVision Rel. 4.7, а статистическую обработку результатов исследования — Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Исследовали возможное токсическое действие НЧ оксида европия в диапазоне концентраций $6,8$ – 340 мкг/мл на клетки СПЭВ и ФЧ в суспензии без отмыывания от НЧ. В ранее проведенном исследовании [10] для культуры СПЭВ было изучено токсическое действие НЧ оксида европия на процессы адгезии и пролиферации. Установлено, что в концентрации $6,8$ мкг/мл НЧ не оказывают существенного влияния на процессы адгезии и пролиферации клеток СПЭВ. При концентрации НЧ оксида европия 17 , 34 , 78 и 102 мкг/мл степень пролиферации клеток снижается. Ингибирование пролиферации усиливается с ростом концентрации НЧ.

После 1 ч инкубации клеточной суспензии с НЧ в концентрации $6,8$ мкг/мл жизнеспособность клеток достоверно не отличалась от контроля (таблица). НЧ в концентрации 34 и 340 мкг/мл уже через 1 ч инкубации снижали жизнеспособность клеток. С ростом концентрации НЧ достоверно уменьшалось количество жизнеспособных клеток: при 34 мкг/мл — в $1,3$ и $1,4$ раза (СПЭВ и ФЧ) статистически достоверно ($P \leq 0,05$) по сравнению с контролем, при 340 мкг/мл — в $2,8$ и $3,7$ раза ($P \leq 0,05$) соответственно. В концентрации 340 мкг/мл НЧ оксида европия вызывали агрегацию клеток после 1 ч инкубации. В люминесцентном микроскопе наблюдали интенсивное свечение конгломератов клеток.

После 3 ч инкубации клеточных суспензий СПЭВ и ФЧ с НЧ в концентрации $6,8$ мкг/мл жизнеспособность клеток достоверно не отличалась от контроля. При действии НЧ в концентрации 34 и 340 мкг/мл жизнеспособность клеток достоверно снижалась.

При концентрации НЧ 34 мкг/мл (СПЭВ и ФЧ) показатель жизнеспособности клеток снижался в $1,4$ раза ($P \leq 0,05$) в обоих случаях. При концентрации НЧ 340 мкг/мл (СПЭВ и ФЧ) жизнеспособность меченых клеток уменьшилась в $5,45$ и $5,8$ раза ($P \leq 0,05$). Следовательно, для мечения культур клеток была выбрана концентрация НЧ $6,8$ мкг/мл.

**Жизнеспособность клеток в суспензиях СПЭВ и ФЧ
в динамике в присутствии наночастиц оксида европия**

Время наблюдения	Жизнеспособность клеток (%)							
	Контроль СПЭВ	Контроль ФЧ	СПЭВ + НЧ 6,8 мкг/мл	ФЧ + НЧ 6,8 мкг/мл	СПЭВ + НЧ 34 мкг/мл	ФЧ + НЧ 34 мкг/мл	СПЭВ + НЧ 340 мкг/мл	ФЧ + НЧ 340 мкг/мл
1 ч	98,4±0,9	98,2±0,3	97,6±2,3	97,7±0,3	77,5±3,4*	77,0±3,4*	34,6±2,4*	25,4±2,4*
2 ч	98,7±0,3	98,1±0,3	96,8±3,6	97,0±0,6	72,3±5,7*	72,4±5,8*	31,2±2,7*	24,2±2,5*
3 ч	98,2±0,2	98,1±0,2	95,6±3,4	96,6±0,4	68,8±3,6*	69,1±3,7*	18,0±1,3*	17,0±1,2*

Примечание. * — $P \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

Для НЧ оксида европия характерна люминесценция в видимой области спектра, поэтому методом отслеживания локализации НЧ Eu_2O_3 в клетках фибробластов и СПЭВ избрана конфокальная сканирующая микроскопия.

Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия является одним из наиболее современных методов исследования клеток [9]. Применение лазерного сканирующего конфокального микроскопа благодаря высокому разрешению и контрасту дало возможность изучать структуру клеток и их органелл. Основными преимуществами этого метода является широкий набор спектральных линий когерентного освещения и возможность параллельной регистрации флуоресценции с различными длинами волн. Как показано на рис. 2, наблюдалось дискретное свечение НЧ оксида европия в цитоплазме клеток в диапазоне эмиссии 540–583 и 593–647 нм, т. е. в зеленой и красной областях спектра.

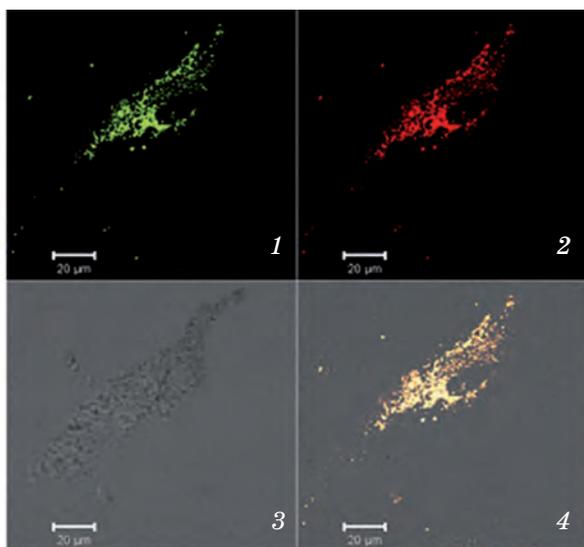


Рис. 2. Микрофотографии культуры фибробластов, меченной наночастицами оксида европия в концентрации 6,8 мкг/мл. Единичные конфокальные планы:

1 — фильтр эмиссии 540–583 нм; 2 — фильтр эмиссии 593–647 нм; 3 — в проходящем свете; 4 — совмещенный план

На рис. 3 представлены спектры люминесценции НЧ оксида европия в цитоплазме фибробласта, меченного НЧ оксида европия. Эмиссия наблюдается в области 450–700 нм с пиками 475 нм, 520 и 550 нм.

Послойное сканирование позволяет визуализировать объемное изображение объекта, определить местоположение метчика и наблюдать процессы непосредственно внутри клетки. С помощью послойного сканирования клеток в культуре было установлено, что НЧ Eu_2O_3 частично адсорбируются на плазматической мембране клеток, при проникновении в клетки локализованы в цитоплазме и не проникают в ядро (рис. 4). Фоновое свечение среды отсутствует, можно видеть единичные люминесцирующие НЧ оксида европия. Таким образом, установлено, что НЧ оксида европия люминесцируют в области эмиссии 540–583 и 593–647 нм, не проникают в ядро клетки и при проникновении в клетки локализованы в цитоплазме.

В дальнейшем была исследована люминесценция НЧ в клетках при культивировании.

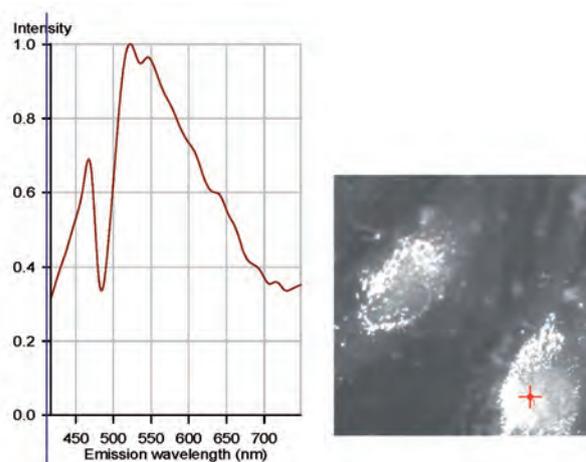


Рис. 3. Спектры испускания наночастиц оксида европия в цитоплазме клеток культуры фибробластов, меченной наночастицами оксида европия в концентрации 6,8 мкг/мл



Рис. 4. Микрофотографии культуры фибробластов, меченной наночастицами оксида европия в концентрации 6,8 мкг/мл: единичные конфокальные планы z-стеков. Стрелками показаны клеточные ядра

После инкубации с НЧ в концентрации 6,8 клетки засеивали в культуральные флаконы и наблюдали в течение около 14 дней.

Микрофото культур ФЧ и СПЭВ в присутствии НЧ оксида европия представлены на рис. 5 и 6. Интенсивность свечения НЧ оксида европия в клетках после культивирования в течение 7 дней была аналогичной для меченых клеток в суспензии. Локализация НЧ в клетках обеих линий в течение всех сроков наблюдения аналогична описанной выше. При этом морфология меченых клеток визуально не отличалась от морфологии немеченых.

Скорость достижения монослоя для клеток, меченных НЧ оксида европия, не отличалась от этого показателя для немеченых, т. е. присутствие НЧ в концентрации 6,8 мкг/мл не влияло на пролиферативный потенциал клеток культур ФЧ и СПЭВ. Анализируя микрофото культур в течение разных сроков культивирования, можно сделать вывод, что люминесценция НЧ Eu_2O_3 сохранялась в течение роста культуры до следующего пересева и в дальнейших пассажах, с некоторым падением интенсивности. НЧ сохраняются в клетках в течение 8–10 делений. При этом их локализация остается постоянной.

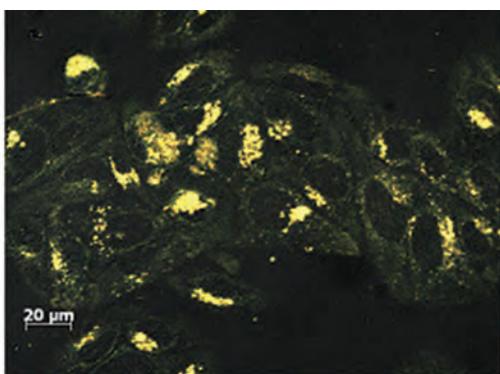


Рис. 5. Культура клеток СПЭВ, меченных наночастицами оксида европия в концентрации 6,8 мкг/мл после 7 дней культивирования: конфокальная микроскопия

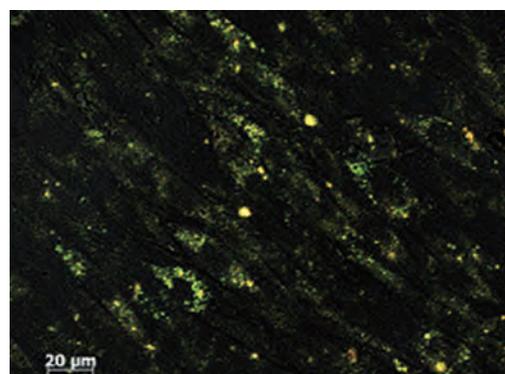


Рис. 6. Культура ФЧ, меченных наночастицами оксида европия в концентрации 6,8 мкг/мл после 10 дней культивирования: конфокальная микроскопия

Оптические свойства НЧ редкоземельных металлов (поглощение света и люминесценция) в большинстве случаев обусловлены переходами между глубоколежащими энергетическими уровнями их 4f-электронов [10]. При введении этих ионов в матрицу заметной перестройки энергетического спектра не происходит, поскольку незаполненные внутренние электронные оболочки редкоземельных металлов хорошо экранированы от внешнего окружения валентными электронами. Воздействие кристаллического поля приводит к незначительному расщеплению энергетических уровней. Вследствие этого энергия перехода незначительно зависит от материала матрицы и от размера НЧ. Линии поглощения и испускания достаточно узкие (1–5 нм и ~10 нм, соответственно) по сравнению с линиями органических красителей или квантовых точек. Люминесценция ионов редкоземельных металлов может происходить в результате воздействия излучения (обычно УФ) на матрицу и последующей передачи энергии иону или непосредственно путем его возбуждения. Однако УФ-излучение — не лучший выбор при исследовании живых клеток и организмов; альтернативой является прямое возбуждение лазером. Спектр люминесценции, как правило, заметно сдвинут относительно спектра поглощения в сторону длинных волн (сдвиг Стокса). Для коллоидных НЧ YVO₄:Eu (ортованадат иттрия, легированный ионами европия) величина сдвига составляет ~150 нм, т. е. существенно больше, чем для обычно используемых органических флуорофоров. Это упрощает проведение исследований.

Авторы работы [10] сравнивали характеристики различных материалов, применяемых в биомедицинских исследованиях. Продолжительность возбужденного состояния для ионов редкоземельных металлов значи-

тельно больше, чем для органических флуорофоров, поэтому и количество испускаемых фотонов в единицу времени для одного излучательного центра намного меньше. Однако в каждой НЧ находятся сотни или тысячи ионов, являющихся источниками излучения, поэтому можно детектировать отдельную единицу.

НЧ редкоземельных металлов отличаются высокой фотостабильностью (быстрое фотообесцвечивание — один из основных недостатков органических красителей), отсутствием мерцания (недостаток квантовых точек), очень узкими линиями излучения, большими стоксовскими (или антистоксовскими) сдвигами, длительной люминесценцией [11, 12]. Все это вместе с возможностью функционализации позволяет использовать такие наночастицы для детектирования ДНК, обнаружения протеинов и изучения их взаимодействий, формирования биоизображений *in vivo* и *in vitro*.

Таким образом, установлено, что НЧ оксида европия в концентрации 6,8 мкг/мл не оказывают токсического действия на клеточные культуры, способны люминесцировать в видимой области спектра и длительно сохраняются в клетках без существенного падения интенсивности свечения. Поэтому их можно применять в качестве нанолуминофоров для мечения суспензий и клеточных культур.

Работа проведена в рамках научного проекта 103/12-Н целевой комплексной программы фундаментальных исследований НАН Украины «Фундаментальные проблемы наноструктурных систем, наноматериалов, нанотехнологий». Автор выражает благодарность проф. Малюкину Ю. В., ИСМА НТК «Институт монокристаллов» НАНУ, за консультации и плодотворное сотрудничество.

REFERENCES

1. Ratra Ch.R., Bhattacharya R., Patra S., Basu S., Mukherjee P., Mukhopadhyay D. Lanthanide phosphate nanorods as inorganic fluorescent labels in cell biology research. *Clin. Chem.* 2007, 53(11), 2029–2031.
2. Gao X., Yang L., Petros J. A., Marshall F. F., Simons J. W., Nie S. *In vivo* molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005, V. 16, P. 63–72.
3. Jaiswal J. K., Mattoussi H., Mauro J. M., Simon S. M. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat. Biotechnol.* 2002, V. 21, P. 47–51.
4. Freshni R. Culture of animal cells. Methods. Moscow: Mir. 1989, 333 p. (In Russian).
5. Birger M. O. Manual for microbiological and virological research methods. *Medistyna, Moscow.* 1982, 462 p. (In Russian).
6. Bazzia R., Flores-Gonzaleza M. A. Synthesis and luminescent properties of sub-5-nm lanthanide oxides nanoparticles. *J. Luminesc.* 2003, 102(103), 445–450.
7. Dyakonov L. P. Living cell in culture. Methods and application in biotechnology. Moscow. 2000, 355 p. (In Russian).
8. Pavalko F. M., Otey C. A. Role of adhesion molecule cytoplasmic domains in mediating

- interactions with the cytoskeleton. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1994, 205(4), 282–293.
9. Pavlovich E. V., Stepanyuk L. V., Goncharyk E. I. Features of adhesion and proliferation processes of cell line SPEV in europium oxide nanoparticles incorporating. *Nanobiophysics: fundamental and applied aspects (6–9 October 2011, Kyiv)*. Kyiv. 2011, P. 106. (In Russian).
10. Bouzigues C., Alexandrou T. G. Biomedical applications of rare-earth based nanoparticles. *ACS Nano*. 2011, 5(11), 8488–8505.
11. Masson J.-B., Casanova D., Türkcan S., Voisine G., Popoff M. R., Vergassola M., Alexandrou A. Interning maps of forces inside cell membrane microdomains, *Phys. Rev. Lett.* 2009, V. 102, 048103.
12. Wang L., Li P., Wan L. Luminescent and hydrophilic LaF₃-polymer nanocomposite for DNA detection. *Luminescence*. 2009, 24(1), 39–44.

НАНОЧАСТИНКИ ОКСИДУ ЄВРОПІЮ ЯК ЛЮМІНЕСЦЕНТНІ МІТКИ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

О. В. Павлович

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, Харків

E-mail: lenapavlovich@gmail.com

Досліджували морфофункціональні характеристики клітин у культурах у присутності наночастинок Eu₂O₃ і особливості їх люмінесценції у клітинах, а також можливу токсичну дію в діапазоні концентрацій 6,8–340 мкг/мл на культури клітин ембріона свині та фібробласти людини в суспензії. Методом конфокальної сканувальної мікроскопії визначали локалізацію наночастинок Eu₂O₃ в клітинах фібробластів і перевивної лінії клітин ембріона нирки свині.

Встановлено, що наночастинок оксиду європію в концентрації 6,8 мкг/мл не спричинюють токсичної дії на клітинні культури, люмінесціюють у видимій ділянці спектра і тривалий час зберігаються в клітинах без істотного зниження інтенсивності світіння. За допомогою конфокальної сканувальної мікроскопії показано, що наночастинок не проникають у ядро клітини і локалізовані в цитоплазмі. Їх можна застосовувати як нанолюмінофори для мічення суспензій і клітинних культур.

Ключові слова: клітинна лінія СПЕВ, фібробласти, наночастинок, люмінофори.

NANOPARTICLES OF EUROPIUM OXIDE AS FLUORESCENT LABELS OF THE CELL CULTURES

O. V. Pavlovich

Institute for Problems of Cryobiology
and Cryomedicine of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kharkiv

E-mail: lenapavlovich@gmail.com

The morphological and functional characteristics of the cells in cultures in the presence of nanoparticles of Eu₂O₃ and luminescence characteristics of nanoparticles in cells and also the possible toxic effect of nanoparticles of Eu₂O₃ in the range of 6.8–340 µg/ml for SPEV cell line, human fibroblasts in suspension were investigated. The localization of Eu₂O₃ nanoparticles in SPEV cells and fibroblasts was determined by confocal scanning microscopy.

We found that europium oxide nanoparticles at a concentration of 6.8 µg/ml did not have a toxic effect on the cell cultures, luminesce in the visible spectral range and remain for a long time in the cells without a significant decrease in intensity of the luminescence. The localization of nanoparticles in cell cytoplasm but not in nuclei was shown by confocal scanning microscopy. They can be used as nanoluminophores for labelling of cell suspensions and cultures.

Key words: SPEV cell line, fibroblasts, nanoparticles, luminophores.