

НЕЦЕЛЕВЫЕ КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ В ПРИЖИЗНЕННЫХ КОНФОКАЛЬНО-МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ КЛЕТОК

© Т. Н. Беляева, А. В. Салова, Е. А. Леонтьева, Т. П. Моженок,
Е. С. Корнилова, С. А. Кроленко

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: tbel@mail.cytspb.rssi.ru*

Проблема неспецифического связывания квантовых точек (КТ) с клетками является важной, учитывая возможность применения КТ в фундаментальных и медицинских исследованиях, однако недостаточно изученной. В настоящей работе с помощью прижизненной лазерной конфокальной микроскопии изучено взаимодействие нецелевых CdSe/ZnS КТ с живыми клетками. Изучали взаимодействие КТ с изолированными одиночными скелетными мышечными волокнами лягушки, клетками HeLa и клетками линии J774. Использовали КТ с максимумом флуоресценции 565 нм, покрытые слоем полиэтиленгликоля, в молекулах которого отсутствовали функциональные реактивные группы. Предполагается, что такое покрытие делает КТ инертными при взаимодействии с биологическими молекулами. Показано, что КТ не проникают в клетки HeLa и в T-систему и саркоплазму скелетных мышечных волокон. Однако обнаружено, что клетки J774 при длительной инкубации способны поглощать нецелевые КТ. Полученные данные демонстрируют разнообразие взаимодействия нецелевых КТ с различными типами клеток, что важно для понимания проблем неселективного поглощения и цитотоксичности используемых КТ.

К л ю ч е в ы е с л о в а: квантовые точки, полиэтиленгликоль, конфокальная микроскопия, мышечные волокна, клетки J774, HeLa.

П р и н я т ы е с о к р а щ е н и я: КТ — квантовые точки, ПЭГ — полиэтиленгликоль, ТОФО — три-октилфосфиноксид (trioctylphosphine oxide).

Современные нанотехнологии, в которых существенное место занимают полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы — квантовые точки (КТ), находят все более широкое применение в фундаментальных и прикладных исследованиях в области биологии и медицины. Преимущества КТ — высокий квантовый выход, высокая фотоустойчивость, широкая полоса возбуждения, узкая симметричная полоса эмиссии, максимум которой строго зависит от размера КТ, большое значение Стоксова сдвига флуоресценции. Эти свойства наряду с широкими возможностями химических модификаций поверхности делают КТ весьма перспективными для маркировки клеток в культуре и в целом организме. Так, они могут быть использованы для адресной доставки различных биологически активных веществ и для исследования внутриклеточных процессов *in vivo* на уровне клеточных микроструктур и отдельных биомолекул (Michalet et al., 2005; Hoshino et al., 2007; Maysinger et al., 2007b; Biju et al., 2008).

Несмотря на стремительное увеличение числа исследований по использованию КТ в клеточной биологии и медицине, многие аспекты взаимодействия КТ с живыми клетками остаются неизученными. Сведения о путях проникновения различных КТ в клетки и ткани, об их внутриклеточном транспорте и возможных цитотоксических влияниях пока еще ограничены и противоречивы (Hild et al., 2008; Barua, Rege, 2009; Delehanty et al., 2009).

Задачей настоящей работы было изучение возможности проникновения нецелевых CdSe/ZnS КТ в живые клетки, для которых основными путями поглощения веществ из внешней среды являются эндоцитоз (клетки карциномы человека HeLa), фагоцитоз (макрофагоподобные клетки мыши линии J774), а также проникновение через узкие инвагинации поверхностной мембраны внутрь клетки (скелетные мышечные волокна). Использовали КТ с максимумом флуоресценции 565 нм, покрытые слоем полиэтиленгликоля (ПЭГ), в молекулах которого отсутствовали функциональные реактивные группы (Invitrogen, США). Такие КТ практически не взаимодействуют с внутриклеточными и внеклеточными макромолекулами, и вопрос о возможности их проникновения в клетки остается открытым (Schipper et al., 2008; Wang et al., 2008; Mok et al., 2009).

Материал и методика

Клетки линии J774 и клетки карциномы человека HeLa (Российская коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) культивировали на покровных стеклах (22×22 мм) в среде DMEM, содержащей 20 mM глутамина, 10 % сыворотки крови плодов коровы и 0.1 % гентамицина в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С.

Эксперименты проводили также на одиночных волокнах или пучках волокон (2—3 волокна), изолированных из *m. illeofibularis* травяной лягушки *Rana temporaria* в зимний период. Подготовка волокон для наблюдения была описана ранее (Кроленко и др., 2003; Krolenko et al., 2006). Изолированное волокно с помощью нитей, привязанных к сухожилиям, помещали на предметное стекло в раствор Рингера. Использовали раствор Рингера для холоднокровных следующего состава (в мМ): NaCl — 111, KCl — 2.4, CaCl₂ — 1.8, NaHCO₃ — 2.4, pH 7.2—7.4. Раствор Рингера на предметном стекле ограничивали тонким слоем высоковакуумной смазки (BDH/Merck, Lutterworth, Leics, Великобритания), на которой закрепляли покровное стекло. Толщина такой камеры, в которой находились мышечные волокна, была менее 100 мкм.

Использовали КТ, покрытые ПЭГ, с максимумом флуоресценции 565 нм (Invitrogen, США). Исходный раствор КТ (2 мкМ) в боратном буфере (50 мМ, pH 8.3) встряхивали на вортексе, разводили в 50 мкл боратного буфера (pH 8.3), снова встряхивали и затем вносили в культуральную среду до конечной концентрации 20 нМ. Для окраски клеток использовали красители акридиновый оранжевый (АО) (Merck, Германия) в концентрации 0.25 мкг/мл, di-8-ANEPPS (Invitrogen, США) в концентрации 5 мкг/мл и RH 414 (Invitrogen, США) в концентрации 15 мкг/мл. Окраску клеток проводили в атмосфере 5 % CO₂ (37 °C) в течение 20 мин.

Исследования проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SL. Флуоресценцию КТ возбуждали аргоновым лазером (488 нм) и регистрировали в области 550—580 нм. При Z-сканировании последовательно снимали 10—12 изображений с шагом 0.6 мкм. Кроме того, флуоресценцию КТ исследовали с помощью режима спектрального сканирования (Mode/хул.) в интервале 510—670 нм с шагом 10 нм. При возбуждении аргоновым лазером (488 нм) собственную флуоресценцию клеток регистрировали в области 540—575 нм, мышечных волокон — в области 505—532 нм. Флуоресценцию АО возбуждали аргоновым лазером (488 нм), регистрировали в двух спектральных областях — зеленой (500—560 нм) и красной (590—660 нм). Флуоресценцию di-8-ANEPPS возбуждали аргоновым лазером (488 нм) и регистрировали в области 590—650 нм. Флуоресценцию RH 414 возбуждали аргоновым лазером (543 нм) и регистрировали в области 635—700 нм. В работе использовали объектив HCX PLAPO CS 63×/1.32. Анализ изображений осуществляли с помощью стандартных программ микроскопа и программы Image J.

Результаты

Для оценки интенсивности и характера флуоресценции КТ, регистрируемых с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL в наших условиях, проводили спектральное сканирование конгломератов КТ как в культуральной среде, так и при их взаимодействии с клетками. На рис. 1 представлен спектр флуоресценции КТ. Видно, что он находится в области 540—590 нм и его максимум расположен в области 565 нм. Можно отметить симметричный характер спектра. Это свидетельствует о том, что условия наблюдения адекватны широко используемым методам в подобных исследованиях в течение последних лет (Maysinger et al., 2007a, 2007b; Biju et al., 2008; Hild et

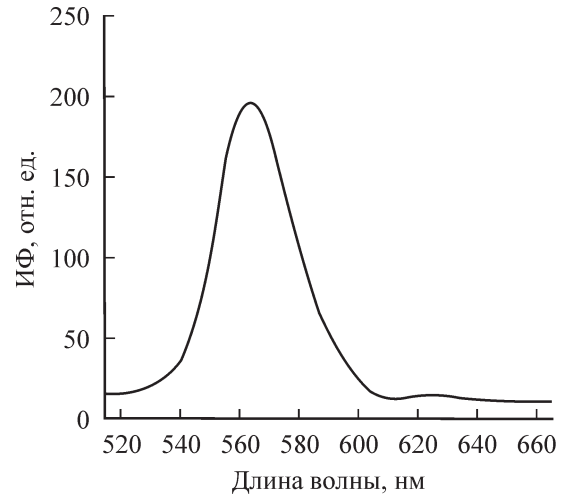


Рис. 1. Спектр флуоресценции квантовых точек (КТ), покрытых полиэтиленгликолем.

Полоса флуоресценции лежит в области 540—590 нм (максимум 565 нм). ИФ — интенсивность флуоресценции КТ.

al., 2008) и обеспечивают возможность проведения эксперимента.

На рис. 2 показано взаимодействие КТ с мышечным волокном. Для выявления поверхностной мембраны волокон и Т-системы (регулярные инвагинации поверхностей мембраны в глубь волокна) использовали мембранный водонерастворимый флуоресцентный краситель RH 414 (рис. 2, а) (Krolenko, Lucy, 2001; Krolenko et al., 2006). Через 1 ч инкубации в растворе с КТ (без RH 414) волокно выявляется в виде темной полосы на фоне флуоресцирующего внеклеточного пространства, содержащего яркие агрегаты КТ различного размера (рис. 2, б, в). В этих опытах мы не наблюдали проникновения КТ внутрь волокна. Слабые флуктуации фонового сигнала внутри волокна не обнаруживают какой-либо периодичности, совпадающей с регистром поперечных трубочек — 2.1—2.3 мкм (данные не показаны). На рис. 2, в, г представлены одновременная регистрация флуоресценции мышечного волокна через 1 ч после инкубации в растворе с КТ в областях 505—532 и 547—588 нм. В области 505—532 нм выявляется только собственная флуоресценция волокна (рис. 2, в); в этих условиях КТ в силу узкого диапазона их флуоресценции становятся невидимыми. При регистрации флуоресценции в области 547—588 нм КТ внутри волокна не выявляются и обнаруживаются в среде (рис. 2, г). Инкубация мышечных волокон с КТ не сопровождается вакуолизацией поперечных трубочек, которая является показателем начальных стадий мышечного некроза и нарушением целостности Т-системы (Кроленко и др., 2007).

Исследуемые нецелевые КТ не проникали также в клетки HeLa (рис. 3). Как видно на рис. 3, КТ выявляются только в среде после инкубации клеток с КТ в течение 3 ч. При более длительной инкубации (до 24 ч) также не обнаружили проникновения КТ в клетки (не показано). Не отмечено за этот период наблюдения каких-либо морфологических признаков повреждения культивируемых клеток.

Для изучения взаимодействия КТ с клетками J774 с целью идентификации клеток использовали органические флуоресцентные красители АО (рис. 4, а, б) и di-8-ANEPPS (рис. 4, в). АО окрашивает ядрышки, цитоплазму и кислые органеллы, di-8-ANEPPS выявляет плазм

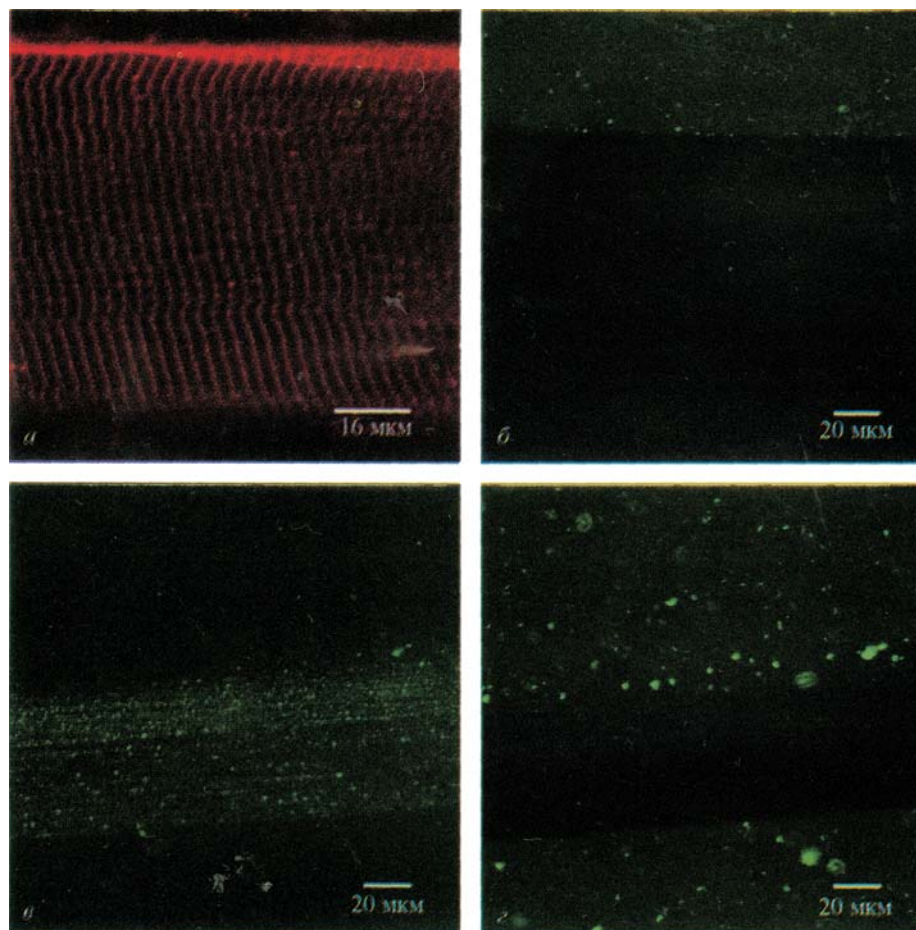


Рис. 2. Конфокальные изображения скелетных мышечных волокон лягушки.

a — локализация поперечных трубочек в интактном мышечном волокне, окраска волокна RH 414 (15 мкг/мл, 20 мин); флуоресценция в красной области (635—700 нм). *б, г* — интактные мышечные волокна после инкубации в растворе с КТ (20 нМ, 1 ч); флуоресценция в области 545—585 нм; волокна выявляются в виде темной полосы на фоне внеклеточного пространства, содержащего КТ; различные размеры КТ отражают степень их агрегации; *в* — те же мышечные волокна, что и *г*, собственная флуоресценция волокон в области 505—532 нм; флуоресценция КТ в этом диапазоне не выявляется.

матическую мембрану. На рис. 4, *в* четко видны очертания клеток. На рис. 4, *г* представлена собственная флуоресценция клеток J774, которая тоже позволяет идентифицировать границы клетки. Можно отметить, что собственная флуоресценция клеток J774 отличается от собственной флуоресценции мышечного волокна (рис. 2, *в*) и выявляет особенности этих клеток. При возбуждении флуоресценции КТ аргоновым лазером (488 нм) регистрировали собственную флуоресценцию мышечного волокна в области 505—532 нм и собственную флуоресценцию клеток J774 в области 540—575 нм. В последние годы конфокальные исследования подтвердили, что флуоресценция в этих областях спектра связана с НАДФН в разных метаболических путях (Chen et al., 2008), НАДН и ФАД, а также с флуоресценцией пиридокселей, фолиевой кислоты и ее производных, каротиноидов и липофусцина (Феофанов, 2007). Идентификация этой флуоресценции с помощью конфокальной микроскопии показана и другими авторами, которые обнаружили, что основная часть собственной флуоресценции клеток связана со свечением митохондрий и лизосом (Andersson et al., 1998). Отсутствие собственной флуоресценции мышечного волокна в области идентификации КТ (545—585 нм) может быть связано со сравнительно небольшим количеством лизосом в этих клетках (Krolenko et al., 2006).

Кратковременная (90 мин) инкубация макрофагоподобных клеток J774 в среде, содержащей КТ, представле-

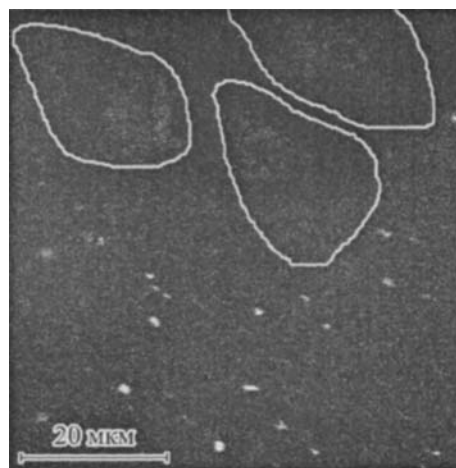


Рис. 3. Конфокальное изображение КТ при инкубации с клетками HeLa.

Инкубация клеток HeLa в среде, содержащей КТ (20 нМ, 3 ч); флуоресценция в области 540—575 нм; КТ выявляются в среде; границы клеток отмечены контурами; клетки не содержат КТ.

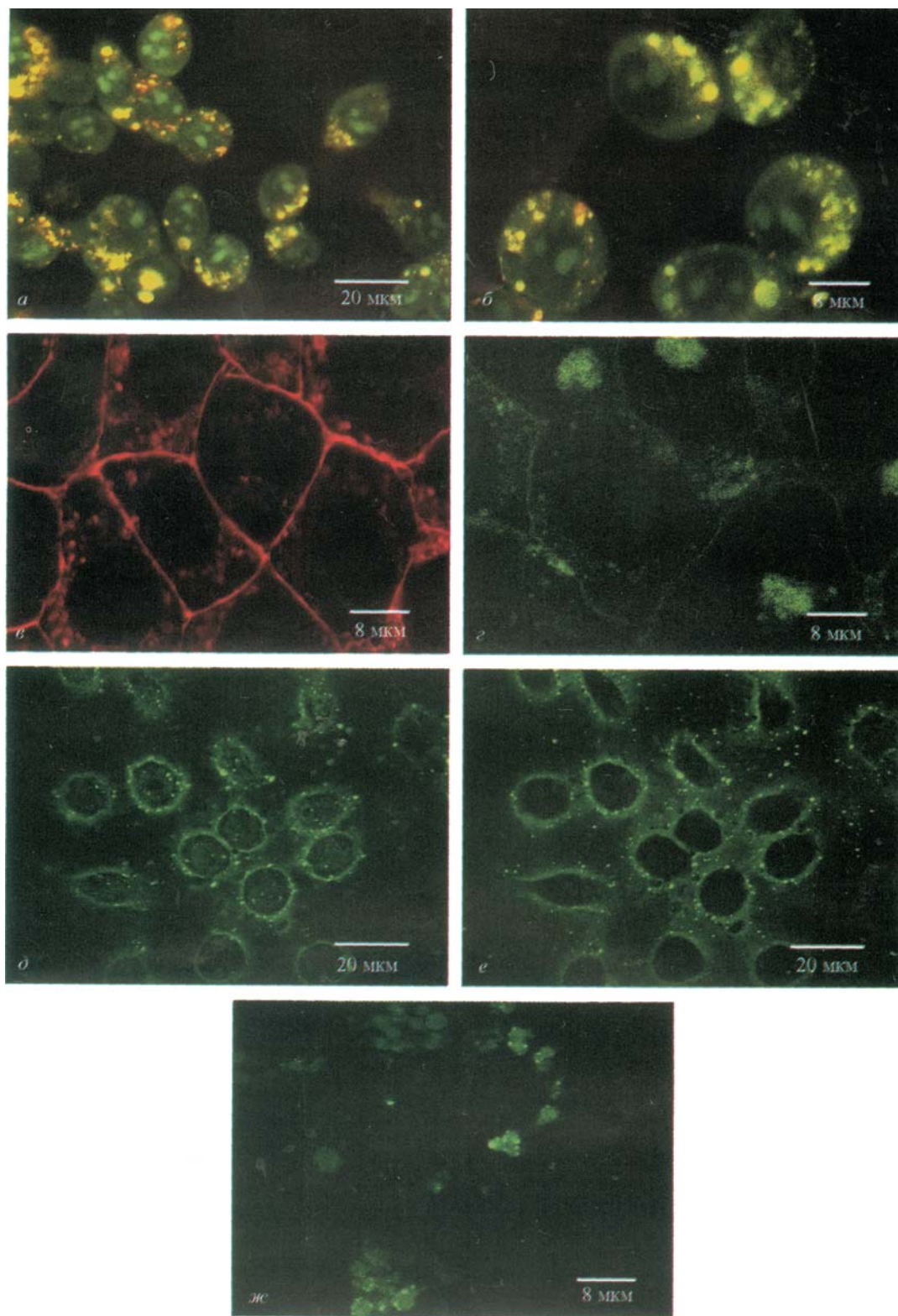


Рис. 4. Конфокальные изображения макрофагов J774.

a, б — макрофаги, окрашенные акридиновым оранжевым (0.25 мкг/мл, 20 мин); видны ядрышки, цитоплазма и кислые органеллы; флуоресценция в двух спектральных областях: зеленой (500—560 нм) и красной (590—660 нм); четко видны клеточные границы; флуоресценция в диапазоне 603—671 нм; *в* — макрофаги, окрашенные di-8-ANEPPS (5 мкг/мл, 20 мин); четко видны клеточные границы; флуоресценция в диапазоне 540—575 нм; *г* — собственная флуоресценция клеток J774 (540—575 нм); *д, е* — два оптических среза из одной Z-серии (10 срезов с шагом 0.6 мкм) после кратковременной (20 мин) инкубации клеток J774 в среде, содержащей КТ (20 нМ); КТ видны на поверхности клетки (*д*) и по ее периметру (*е*) и отсутствуют внутри клетки; флуоресценция в области 540—575 нм; *жс* — поглощение КТ в виде гранул разного размера после длительной (около 20 ч) инкубации клеток J774 в среде, содержащей КТ (20 нМ); флуоресценция в области 540—575 нм.

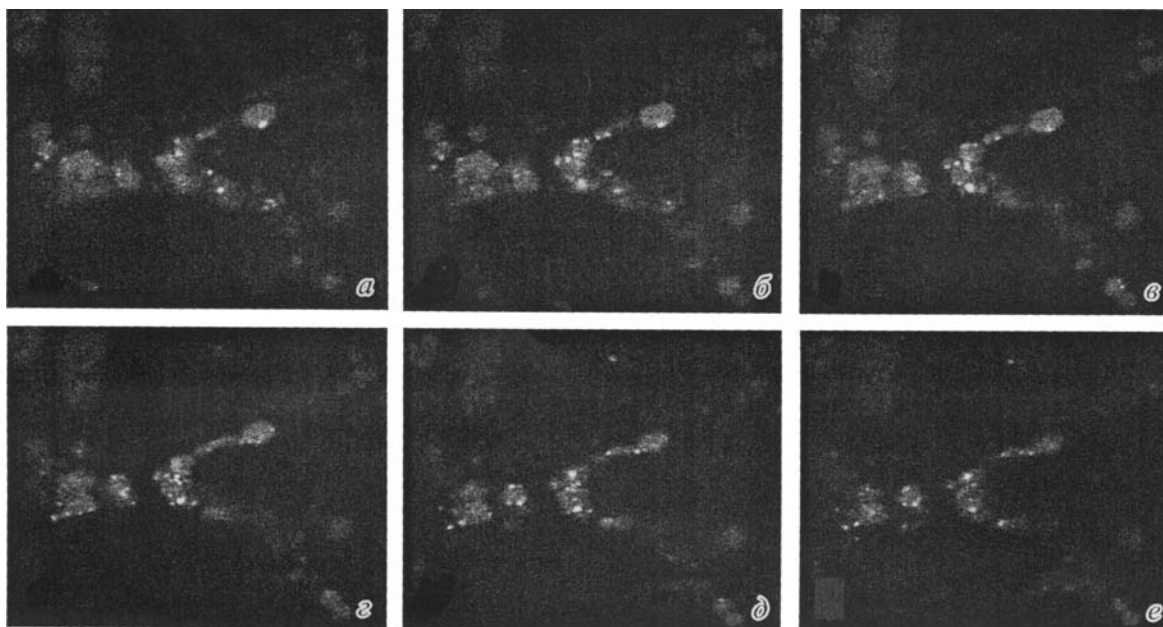


Рис. 5. Z-сканирование клеток J774 после их длительной инкубации (около 20 ч) в среде, содержащей КТ (20 нМ). *a–e* — оптические срезы из одной Z-серии (10 срезов с шагом 0.6 мкм) показывают пространственную локализацию КТ в клетках; флуоресценция в области 540—575 нм.

на на рис. 4, *д, е*. На двух оптических срезах из одной Z-серии (10 срезов с шагом 0.6 мкм) видны локализация КТ на поверхности клетки и по ее периметру и отсутствие КТ во внутриклеточном пространстве. Следует отметить, что большое число агрегатов КТ формирует ореол вокруг клеточной мембраны (рис. 4, *е*). Инкубация клеток J774 в среде с КТ в течение 3 ч выявляет отдельные случаи интернализации КТ (не показано). Только длительная (около 20 ч) инкубация выявляет поглощение КТ клетками J774 (рис. 4, *ж*). Накопление КТ в гранулах разного размера, а также их пространственная локализация в клетке хорошо видны при Z-сканировании (рис. 5). Во время длительной инкубации макрофагоподобных клеток J774 с КТ мы не наблюдали таких морфологических изменений клеток, как вакуолизация, а также открепления клеток от субстрата и гибели клеток.

Обсуждение

Как известно, КТ, применяемые в биологических исследованиях, имеют многослойную оболочку. Используемые нами КТ имеют CdSe-ядро, ZnS-оболочку, покрытую триоктилфосфиноксидом ТОФО, или ТОРО в англоязычной литературе), и ПЭГ-оболочку (Sukhanova et al., 2004; Michalet et al., 2005; Олейников и др., 2007). Оболочка из полупроводника ZnS обеспечивает высокий квантовый выход флуорофоров вне зависимости от свойств окружающей среды. ТОФО определяет долговременную стабильность нанокристаллов в органических растворителях и их гидрофобные свойства. Для использования CdSe/ZnS нанокристаллов, покрытых слоем ТОФО, в биологических средах требуются изменение свойств их поверхности и формирование на поверхности частиц гидрофильных групп, часть из которых могла бы далее быть спейсером для присоединения к ним биологических молекул. Для этой цели в биологии часто используется покрытие ПЭГ. В частности, ПЭГ применяется как стерический

протектор в системах доставки биологически активных молекул при создании липосом и полимерных мицелл (Allen et al., 1991; Hagan et al., 1996; Moghimi et al., 2001). ПЭГ имеет низкую степень иммуногенности и антигенности (Abuchowski et al., 1977a, 1977b). Несмотря на то что ПЭГ химически инертен, в его составе имеются первичные гидроксильные радикалы, которые позволяют получать производные ПЭГ с активными функциональными группами (Zalipsky, 1995; Monfardini, Veronese, 1998). КТ, покрытые ПЭГ, имеют нейтральный поверхностный заряд и способны поддерживать коллоидную стабильность при различных экспериментальных условиях.

Оболочка из ПЭГ уменьшает неспецифическое связывание и поглощение КТ клетками (Hild et al., 2008). Эти свойства ПЭГ были использованы при исследовании целевых КТ, конъюгированных с пептидами и способных связываться с клетками опухоли и ее сосудами, *in vivo* на мышах и *in vitro* на клеточных линиях (Akerman et al., 2002). Этими авторами показано, что при замещении части молекул пептидов на поверхности КТ молекулами ПЭГ поглощение таких КТ ретикулоэндотелиальной системой печени и селезенки уменьшается на 95 %, в то время как специфическое связывание КТ с опухолевыми мишенями не изменяется. При введении КТ, покрытых ПЭГ, в хвостовую вену *in vivo* мышам-носителям опухоли U87MG не обнаруживается зон накопления КТ; такая циркуляция КТ обусловлена нейтральными свойствами их поверхности (Cai, Chen, 2008). В опытах *in vitro* показано, что при покрытии КТ оболочкой из ПЭГ неспецифическое связывание резко снижается (Bentzen et al., 2005).

В экспериментах по взаимодействию КТ, покрытых ПЭГ, мы не наблюдали их проникновения в Т-систему и саркоплазму скелетных мышечных волокон (рис. 2). Полость поперечных трубочек скелетных мышечных волокон соединяется с внеклеточным пространством и может рассматриваться как особая форма организации внеклеточной среды внутри мышечного волокна, аналогичная узким межклеточным пространствам многих тканей. По-

лость Т-трубочек поперечнополосатых скелетных мышечных волокон позвоночных, по данным электронной микроскопии, имеет размер 20—40 нм с локальными расширениями до 80 нм (Кроленко, 1975; Dauber et al., 2000; Krolenko, Lucy, 2001). Она доступна для диффузии таких крупных белков, как ферритин, диаметр молекулы которого составляет порядка 11 нм. Ферритин заполняет практически всю полость Т-системы изолированного волокна лягушки в течение 1 ч (Кроленко, 1975; Krolenko, Lucy, 2001). Размеры КТ, покрытых ПЭГ, составляют 15 нм (Molecular Probes/Invitrogen, США), по литературным данным, их гидродинамический диаметр может достигать 20—35 нм (Ryman-Rasmussen et al., 2006; Maysinger et al., 2007; Kairdolf et al., 2008). Показана диффузия КТ, покрытых метокси-полиэтиленгликолем, в межклеточных пространствах нервной ткани, диаметр которых сопоставим с размерами Т-трубочек (Thorne, Nicholson, 2006). Недоступность полости поперечных трубочек для КТ в наших экспериментах, вероятно, обусловлена как инертными свойствами КТ, так и их размерами (рис. 2). Данные о проникновении КТ, покрытых ПЭГ, в мышечные клетки в литературе отсутствуют. Представлены только данные о проникновении целевых КТ в кардиомиоциты (Koshman et al., 2008).

Мы показали, что КТ, покрытые ПЭГ, не накапливаются внутри клеток HeLa (рис. 3). В отличие от мышечных волокон взаимодействие КТ, покрытых ПЭГ, с клетками HeLa изучали и другие авторы (Duan, Nie, 2007; Kairdolf et al., 2008; Lee et al., 2008; Liu et al., 2008). Однако в этих работах использовали ПЭГ с различными модификациями, включающими в его состав реактивные группы, что обеспечивало проникновение этих КТ в клетки.

Тем не менее некоторые клетки способны поглощать КТ, покрытые ПЭГ. Так, КТ, покрытые ПЭГ, обнаруживаются в клетках эпидермальных кератиноцитов человека (NHЕК) (Ryman-Rasmussen et al., 2007a, 2007b). В этих работах изучали механизмы поглощения нецелевых КТ. Анализ с использованием ингибиторов эндоцитоза и клеточного цикла показал, что эти процессы играют роль в поглощении КТ кератиноцитами. Мы наблюдали проникновение КТ, покрытых ПЭГ, в макрофагоподобные клетки J774 (рис. 4, 5). Как и в случае кератиноцитов, проникновение КТ увеличивается при длительной инкубации. Для поглощения макрофагами макромолекул, бактерий и вирусов важны, в частности, электростатические и гидрофобные взаимодействия. По всей вероятности, благодаря свойствам ПЭГ исследуемые нами КТ обладают способностью блокировать эти взаимодействия. Однако в случае длительной инкубации или циркуляции могут происходить процессы деградации и эрозии полимерной оболочки ПЭГ (Mainardes et al., 2008); это может приводить к морфологическим и поверхностным изменениям КТ, которые будут индуцировать фагоцитоз. Введение NH₂ в состав ПЭГ (NH₂-ПЭГ-КТ), что приводит к появлению заряда ПЭГ и изменениям поверхностных характеристик ПЭГ, позволяет регистрировать поглощение КТ макрофагами методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии (Clift et al., 2008). При рассмотрении вопроса о поглощении КТ клетками существенным является то, что этот процесс может определяться типом клеток, в частности их фагоцитарной способностью. Это подтверждают и наши данные по поглощению КТ макрофагоподобными клетками J774.

Необходимо отметить, что КТ, покрытые ПЭГ, в основном используют после их функционализации. В ча-

стности, присоединение карбоксильных или аминогрупп к ПЭГ способствует проникновению КТ в клетки (Ballou et al., 2007; Susumu et al., 2007; Wang et al., 2008). Наиболее важным является использование в качестве функциональных групп различных лигандов, которые обеспечивают целенаправленную доставку КТ (Duan, Nie, 2007; Cai, Chen, 2008; Liu et al., 2008). КТ, покрытые ПЭГ и обладающие инертными свойствами, могут служить контролем для таких систем. Поэтому полученные нами данные позволят помочь решению проблем снижения неселективного поглощения и цитотоксичности используемых КТ.

Мы благодарим за участие в обсуждении результатов работы С. Я. Адамян и Г. И. Штейна (Институт цитологии РАН).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00817), Программы фундаментальных исследований президиума РАН № 27 «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов» и при использовании оборудования Центра коллективного пользования «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

Список литературы

- Кроленко С. А. 1975. Т-система мышечных волокон. Л.: Наука. 128 с.
- Кроленко С. А., Адамян С. Я., Беляева Т. Н., Моженок Т. П. 2003. Локализация кислых органоидов в скелетных мышечных волокнах лягушки. Цитология. 45 (7) : 714—721.
- Кроленко С. А., Адамян С. Я., Беляева Т. Н., Моженок Т. П., Салова А. В. 2007. Конфокально-микроскопическое исследование мембранных органоидов скелетного мышечного волокна в процессе распространяющегося некроза. Цитология. 49 (2) : 107—114.
- Олейников В. А., Суханова А. В., Набиев И. Р. 2007. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине. Российские нанотехнологии. 2 (1-2) : 160—173.
- Феофанов А. В. 2007. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях. Успехи биол. хим. 47 : 371—410.
- Abuchowski A., McCoy J. R., Palczuk N. C., van Es T., Davis F. F. 1977a. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. J. Biol. Chem. 252 : 3582—3586.
- Abuchowski A., van Es T., Palczuk N. C., Davis F. F. 1977b. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. J. Biol. Chem. 252 : 3578—3581.
- Akerman M. E., Chan W. C., Laakkonen P., Bhatia S. N., Ruoslahti E. 2002. Nanocrystal targeting *in vivo*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 12 617—12 621.
- Allen T. M., Hansen C., Martin F., Redemann C., Yau-Young A. 1991. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*. Biochim. biophys. acta. 1066 : 29—36.
- Andersson H., Baechli T., Hoechl M., Richter C. 1998. Autofluorescence of living cells. J. Microsc. 191 : 1—7.
- Ballou B., Ernst L. A., Andreko S., Harper T., Fitzpatrick J. A., Waggoner A. S., Bruchez M. P. 2007. Sentinel lymph node imaging using quantum dots in mouse tumor models. Bioconjug. Chem. 18 : 389—396.
- Barua S., Rege K. 2009. Cancer-cell-phenotype-dependent differential intracellular trafficking of unconjugated quantum dots. Small. 5 : 370—376.
- Bentzen E. L., Tomlinson I. D., Mason J., Gresch P., Warneament M. R., Wright D., Sanders-Bush E., Blakely R., Rosenthal S. J.

2005. Surface modification to reduce nonspecific binding of quantum dots in live cell assays. *Bioconjug. Chem.* 16 : 1488—1494.
- Biju V., Itoh T., Anas A., Sujith A., Ishikawa M. 2008. Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 391 : 2469—2495.
- Cai W., Chen X. 2008. Preparation of peptide-conjugated quantum dots for tumor vasculature-targeted imaging. *Nat. Protoc.* 3 : 89—96.
- Chen R., Chen J. Y., Zhou L. W. 2008. Metabolic patterns (NAD(P)H) in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells and human hepatocellular carcinoma (Hep G2) cells with autofluorescence imaging. *Ultrastruct. Pathol.* 32 : 193—198.
- Clift M. J., Rothen-Rutishauser B., Brown D. M., Duffin R., Donaldson K., Proudfoot L., Guy K., Stone V. 2008. The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232 : 418—427.
- Dauber W., Voigt T., Hartel X., Mayer J. 2000. The T-tubular network and its triads in the sole plate sarcoplasm of the motor end-plate of mammals. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 21 : 443—449.
- Delehanty J. B., Mattoussi H., Medintz I. L. 2009. Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues. *Anal. Bioanal. Chem.* 393 : 1091—1105.
- Duan H., Nie S. 2007. Cell-penetrating quantum dots based on multivalent and endosome-disrupting surface coatings. *J. Amer. Chem. Soc.* 129 : 3333—3338.
- Hagan S. A., Coombes A. G. A., Garnett M. C., Dunn S. E., Davies M. C., Illum L., Davis S. S. 1996. Polylactide-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery systems. 1. Characterization of water dispersible micelle-forming systems. *Langmuir.* 12 : 2153—2161.
- Hild W. A., Breunig M., Goepferich A. 2008. Quantum dots — nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 : 153—168.
- Hoshino A., Manabe N., Fujioka K., Suzuki K., Yasuhara M., Yamamoto K. 2007. Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine: surface modification regulates biological function, including cytotoxicity. *J. Artif. Organs.* 10 : 149—157.
- Kairdolf B. A., Mancini M. C., Smith A. M., Nie S. 2008. Minimizing nonspecific cellular binding of quantum dots with hydroxyl-derivatized surface coatings. *Anal. Chem.* 80 : 3029—3034.
- Koshman Y. E., Waters S. B., Walker L. A., Los T., de Tombe P., Goldspink P. H., Russell B. 2008. Delivery and visualization of proteins conjugated to quantum dots in cardiac myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 45 : 853—856.
- Krolenko S. A., Adamyan S. Ya., Belyaeva T. N., Mozhenok T. P. 2006. Acridine orange accumulation in acid organelles of normal and vacuolated frog skeletal muscle fibres. *Cell Biol. Int.* 30 : 933—939.
- Krolenko S. A., Lucy J. A. 2001. Reversible vacuolation of T-tubules in skeletal muscle: mechanisms and implications for cell biology. *Int. Rev. Cytol.* 202 : 243—298.
- Lee J., Kim J., Park E., Jo S., Song R. 2008. PEG-ylated cationic CdSe/ZnS QDs as an efficient intracellular labeling agent. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 : 1739—1742.
- Liu W., Howarth M., Greytak A. B., Zheng Y., Nocera D. G., Ting A. Y., Bawendi M. G. 2008. Compact biocompatible quantum dots functionalized for cellular imaging. *J. Amer. Chem. Soc.* 130 : 1274—1284.
- Mainardes R. M., Gremiao M. P., Brunetti I. L., da Fonseca L. M., Khalil N. M. 2008. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. *J. Pharm. Sci.* 98 : 257—267.
- Maysinger D., Behrendt M., Lalancette-Hebert M., Kriz J. 2007a. Real-time imaging of astrocyte response to quantum dots: *in vivo* screening model system for biocompatibility of nanoparticles. *Nano Lett.* 7 : 2513—2520.
- Maysinger D., Lovric J., Eisenberg A., Savic R. 2007b. Fate of micelles and quantum dots in cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65 : 270—281.
- Michalet X., Pinaud F. F., Bentolila L. A., Tsay J. M., Doose S., Li J. J., Sundaresan G., Wu A. M., Gambhir S. S., Weiss S. 2005. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science.* 307 : 538—544.
- Moghimi S. M., Hunter A. C., Murray J. C. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 53 : 283—318.
- Mok H., Bae K. H., Ahn C. H., Park T. G. 2009. PEGylated and MMP-2 specifically dePEGylated quantum dots: comparative evaluation of cellular uptake. *Langmuir.* 25 : 1645—1650.
- Monfardini C., Veronese F. M. 1998. Stabilization of substances in circulation. *Bioconjug. Chem.* 9 : 418—450.
- Ryman-Rasmussen J. P., Riviere J. E., Monteiro-Riviere N. A. 2006. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol. Sci.* 91 : 159—165.
- Ryman-Rasmussen J. P., Riviere J. E., Monteiro-Riviere N. A. 2007a. Variables influencing interactions of untargeted quantum dot nanoparticles with skin cells and identification of biochemical modulators. *Nano Lett.* 7 : 1344—1348.
- Ryman-Rasmussen J. P., Riviere J. E., Monteiro-Riviere N. A. 2007b. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 127 : 143—153.
- Schipper M. L., Iyer G., Koh A. L., Cheng Z., Ebenstein Y., Aharoni A., Keren S., Bentolila L. A., Li J., Rao J., Chen X., Bannin U., Wu A. M., Sinclair R., Weiss S., Gambhir S. S. 2008. Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice. *Small.* 5 : 126—134.
- Sukhanova A., Devy J., Venteo L., Kaplan H., Artemyev M., Oleinikov V., Klinov D., Pluot M., Cohen J. H., Nabiev I. 2004. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells. *Anal. Biochem.* 324 : 60—67.
- Susumu K., Uyeda H. T., Medintz I. L., Pons T., Delehanty J. B., Mattoussi H. 2007. Enhancing the stability and biological functionalities of quantum dots via compact multifunctional ligands. *J. Amer. Chem. Soc.* 129 : 13 987—13 996.
- Thorne R. G., Nicholson C. 2006. *In vivo* diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 103 : 5567—5572.
- Wang L., Nagesha D. K., Selvarasah S., Dokmeci M. R., Carrier R. L. 2008. Toxicity of CdSe nanoparticles in Caco-2 cell cultures. *J. Nanobiotechnol.* 6 : 11—26.
- Zalipsky S. 1995. Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates. *Bioconjug. Chem.* 6 : 150—165.

UNTARGETED QUANTUM DOTS IN CONFOCAL MICROSCOPY OF LIVING CELLS

T. N. Belyaeva, A. V. Salova, E. A. Leontieva, T. P. Mozhenok, E. S. Kornilova, S. A. Krolenko

Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg;
e-mail: tbel@mail.cytspb.rssi.ru

The problem of non-specific binding of quantum dots (QDs) with cells is very important but not fully understood taking into account the possible application of QDs in medical and fundamental studies. The interactions of untargeted CdSe/ZnS QDs with isolated frog muscle fibres, HeLa cells and J774 cells were investigated. The observations were performed on living cells using laser confocal microscopy (Leica TCS SL). The QDs covered with polyethylenglycol without any functional reactive groups with emission maximum at 565 nm were used in the study. This type of QDs is suggested to prevent an interaction of QDs with biological molecules. It has been shown that QDs do not enter HeLa cells, T-system and sarcoplasm of skeletal muscle fibres. However, during long-term incubation J774 cells can uptake QDs. The data obtained has demonstrated the diversity of interactions of untargeted QDs with different cell types and are important for understanding of the problems of non-selective uptake and cytotoxicity of QDs.

Key words: quantum dots, polyethylenglycol, confocal microscopy, muscle fibres, J774 cells, HeLa.
