

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ НАНОЧАСТИЦ С ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИМ ЦЕНТРОМ Er/Yb В СИСТЕМЕ С НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ГРАНУЛОЦИТАМИ

© С. Н. Плескова,^{1, 2, *} Е. Н. Горшкова,¹ Э. Р. Михеева,^{1, 2} А. Н. Шушунов¹

¹ Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
² Нижегородский государственный технический университет им. Р. Е. Алексеева;
* электронный адрес: pleskova@mail.ru

Флуоресцентные метки активно применяются для диагностики и маркирования *in vivo* и *in vitro*. В представленной работе наноразмерные флуорофоры с флуоресцирующим центром Er/Yb тестировали на нейтрофильных гранулоцитах с целью установления возможного токсического эффекта. Выявлено токсическое влияние флуорофора на кислородозависимый метаболизм нейтрофила, его ферментные системы, на рецепторопосредованные реакции клеток и на ригидность клеточных мембран. Жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов (по результатам окраски пропидиумом йодидом) через 2 ч инкубации с наноразмерным флуорофором в концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} мМ составила 27.0 ± 6.6 и 19.07 ± 3.34 % соответственно.

Ключевые слова: наноразмерные флуорофоры, нейтрофильные гранулоциты, жизнеспособность.

Принятые сокращения: АСМ — атомно-силовая микроскопия, ИК — инфракрасный, ЛКТ — лизосомно-катионный тест, НСТ — нитросиний тетразолий, СЦК — средний цитохимический коэффициент.

Высокая информативность, специфичность, стандартность и низкая себестоимость выводят методы диагностики с использованием флуоресцентных меток на одну из лидирующих позиций. Флуорофоры можно использовать как для специфического мечения клеточных структур (после их конъюгации с антителами), так и применять в качестве самостоятельных систем для исследования процессов интернализации, фагоцитоза и внутриклеточного транспорта. Однако перед внедрением в практику необходимо проводить комплексное исследование их биосовместимости (Flahaut, 2010; Levy et al., 2010). Примером такого рода исследований является выявление достаточно высокой токсичности у квантовых точек (Shiohara et al., 2004; Guo et al., 2007; Fujioka et al., 2008).

Поскольку флуоресцентные метки могут быть использованы *in vivo*, а при изучении внутриклеточного транспорта необходимо опираться на движение частиц, которые не должны оказывать ингибирующее влияние на транспортную систему клетки, проблема отсутствия токсичности у всех синтезируемых в настоящее время наномаркеров выходит на первое место. Химический синтез позволяет получать материалы с флуоресцентными и люминесцентными свойствами, которые не теряют своих преимуществ (наноразмерный диапазон, высокий квантовый выход, высокая стабильность) и в то же время являются абсолютно безопасными (Орлова и др., 2006; Chermont et al., 2007; Benhamou et al., 2009).

В представленной работе были использованы наночастицы с флуоресцирующим центром Er/Yb. Этот состав

обладает целым рядом ценных для флуорофора качеств: 1) малый (нанометровый) размер частиц; 2) низкая температура химического синтеза; 3) химическая устойчивость и стабильность оптических параметров; 4) возбуждение свечения лазером в ИК-диапазоне, максимально проникаемом для биологических тканей; 5) эмиссия в видимой области спектра, что снимает необходимость в дополнительной регистрирующей аппаратуре.

Основной целью работы являлось тестирование биосовместимости наночастиц в системе с нейтрофильными гранулоцитами. В качестве тест-объекта нейтрофильные гранулоциты были отобраны по целому ряду причин. Во-первых, любой вариант введения наноматериалов при использовании *in vivo* предполагает контакт с клетками неспецифической и специфической иммунной защиты, а следовательно, необходимо исследовать возможность фагоцитоза наночастиц. Во-вторых, нейтрофил относится к группе клеток с высокой морфологической пластичностью: он подвергается заметным внешним перестройкам как в процессе реализации своих физиологических функций, так и в ответ на альтерирующее внешнее воздействие. В-третьих, нейтрофильные гранулоциты являются клетками с богатым деструктивным потенциалом, т. е., с одной стороны, они неизбежно запускают механизмы биодеструкции вновь поглощенных частиц, с другой стороны, частицы в исходном или трансформированном состоянии могут оказывать негативное воздействие на различные звенья цитотоксического комплекса нейтрофилов. Поэтому были поставлены задачи анализа влияния

наночастиц с флуоресцирующим центром Er/Yb на кислородозависимый и кислородонезависимый метаболизм нейтрофила, на ферментные системы клетки, на морфологию нейтрофильных гранулоцитов и на ригидность клеточной мембраны.

Материал и методика

Нейтрофильные гранулоциты выделяли из венозной крови здоровых людей (Подосинников и др., 1981). Число живых клеток к началу эксперимента по тесту с трипановым синим составляло не менее 99 %. Жизнеспособность клеток в контроле и после воздействия наночастиц оценивали по результатам окраски пропидиумом йодидом (Sigma, США). Для окрашивания клетки фиксировали на подложке этиловым спиртом (70 %, 10 мин), затем отмывали и окрашивали 0.025%-ным раствором пропидиума йодида. После пятикратного отмывания учитывали долю окрашенных (погибших) из 100 просмотренных клеток.

Наночастицы с флуоресцирующим центром Er/Yb перед экспериментом разбивали в ультразвуковой ванне (РЭЛТЭК, Россия) в течение 15 мин, добиваясь гомогенизации, после чего суспензию доводили до рабочей концентрации (10^{-3} или 10^{-4} мМ). Измерение частиц проводили методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Для этого предварительно взвешенные в дистиллированной воде и разбитые в ультразвуковой ванне наночастицы наносили на поверхность предметного стекла. Полученный образец высушивали и отмывали дистиллированной водой для получения минимального слоя осевших наночастиц, после чего проводили сканирование поверхности с использованием атомно-силового микроскопа SOLVER BIO™ (NT-MDT, Россия) и зондов MSCT-Au (Veeco, США). В программе SPMLab Analysis Only (Topometrix, США) по боковому профилю рассчитывали размеры частиц. Полученные данные подвергали статистической обработке в программе Origin 5.0 Server. Спектр люминесценции наночастиц исследовали, возбуждая люминесценцию лазером JDS Uniphase Ltd. (China, 660 мВт, $\lambda = 980$ нм).

АСМ-исследования нативных клеток в режиме реального времени проводили по методике Плесковой с соавторами (2005). Исследование морфологии вези в витальном состоянии в полуконтактном режиме. Для сканирования использовали зонды DNP (Veeco, США) с радиусом закругления 50 нм, углом 70° , резонансной частотой в жидкости около 14 кГц.

Для оценки ригидности мембран использовали метод силовых кривых в режиме спектроскопии АСМ. Расчет ригидности мембран проводили, определяя модуль Юнга по модели Герца (Bukharaev et al., 2003). Исследования поверхности клеток проводили в физиологическом растворе с использованием контактных зондов MSCT-Au (Veeco, США). В серии экспериментов изучали клетки, полученные из крови здоровых доноров, и сравнивали показатели упругости мембраны нейтрофилов до и после добавления флуорофора. Для этого проводили обзорное сканирование поля размером 60×60 мкм и выбирали несколько клеток для измерения. После 20 контрольных измерений в чашку Петри добавляли исследуемые наночастицы. После инкубации в течение 30 мин с наночастицами проводили до 20 измерений клеток. Для визуализации сканируемых объектов использовали программу Nova NT-MDT SPM Software (NT-MDT, Россия). При дальней-

шей обработке данных использовали программное обеспечение SPMLab Analysis Only (Topometrix, США).

Для оценки эффективности протекания кислородонезависимых защитных реакций нейтрофильных гранулоцитов проводили лизосомно-катионный тест (ЛКТ) (Пигаревский, 1988). Высушенные мазки фиксировали в спиртовом растворе формалина 10—15 с. Для избирательной окраски катионного белка гранулоцитов использовали забуференный спиртовой раствор прочного зеленого (Sigma, США). Для окраски ядер использовали раствор азур А (Sigma, США). Микроскопирование проводили на световом оптическом микроскопе Olympus IX71 с использованием иммерсионного объектива $100\times$ (Olympus, Япония). При микроскопировании просматривали 100 гранулоцитов. Внутриклеточное содержание катионных белков гранулоцитов оценивали по величине среднего цитохимического коэффициента (СЦК), вычисляемого по формуле

$$\text{СЦК} = (3a + 2b + 1.5v + 1g + 0.5d + 0e)/100,$$

где а—д — количество клеток с определенной степенью окраски гранул, а цифры являются показателями степени выраженности окраски. Помимо определения СЦК проводили дифференциальную оценку цитоспиновых препаратов, учитывая из 100 клеток процентное соотношение малоактивных, среднеактивных и высокоактивных клеток.

Кислородозависимый метаболизм нейтрофильных гранулоцитов оценивали по методу Маянского и Пикуза (1993); в основе метода лежала реакция восстановления нитросинего тетразолия (Sigma, США): при формировании активных форм кислорода в цитоплазме накапливаются гранулы нерастворимого диформаза. Оценивали количество нерастворимых гранул до инкубации с наночастицами (контроль) и после инкубации в течение 60 мин (опыт). НСТ-тест проводили в двух вариантах: спонтанный вариант определял число диформаза гранул в цитоплазме клеток в отсутствие стимуляции; индуцированный учитывал количество гранул диформаза после реализации респираторного взрыва, индуцированного опсонизированным зимозаном.

Исследования активности щелочной фосфатазы проводили по методу азосочетания (Шубич, Нагоев, 1980), а кислотной фосфатазы — по методу Шубич и Нестеровой (1980), используя готовые наборы (Химтехмаш, Россия) для окрашивания мазков, фиксированных в смеси спирта с формалином (1 : 9, 30 с, 24°C) (Эль Групп, Россия). При микроскопировании просматривали 100 гранулоцитов. Внутриклеточное содержание гидролитических ферментов оценивали по величине среднего цитохимического коэффициента (СЦК).

Рецепторозависимую адгезию на гранулах сефадекса, опсонизированных СЗб-компонентом комплемента, оценивали по методу Маянского и соавторов (1989). Статистический анализ проводили в пакете Origin 5.0 Server.

Результаты и обсуждение

Для характеристики наночастиц с флуоресцирующим центром Er/Yb было проведено исследование их размеров и определен характер эмиссии в видимой части спектра. Размеры частиц с флуоресцирующим центром Er/Yb составили 82.17 ± 25.75 нм, т. е. лежали в нанометровом

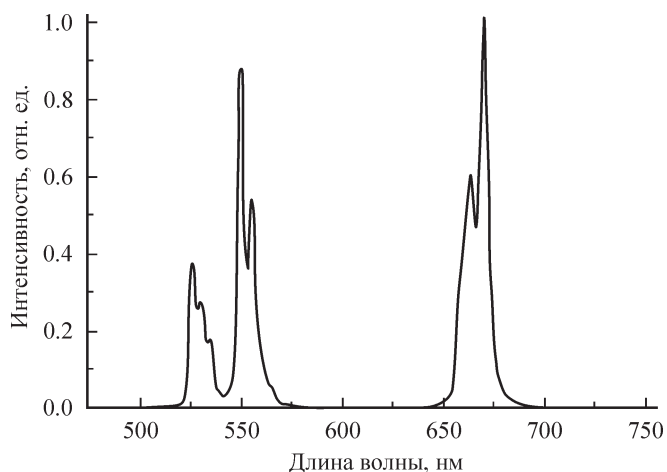


Рис. 1. Спектр люминесценции активного состава нанопорошка с флуоресцирующими центрами Er/Yb в видимой части спектра.

диапазоне. Для оценки интенсивности и характера свечения наночастиц в видимой части спектра проводили определение спектра флуоресценции (рис. 1). Возбуждение флуоресценции проводили аргоновым лазером (JDS Uniphase Ltd., China; $\lambda = 980$ нм).

Из данных рис. 1 следует, что эмиссионный спектр носит двухпиковый характер и за счет антистоксового сдвига обнаруживается в видимой части спектра. Приведенный спектр свидетельствует, во-первых, о возможности наблюдения за наночастицами в зеленой области спектра (530—560 нм), что удобно, поскольку он не перекрывается с аутофлуоресценцией клеток; во-вторых, о достаточно интенсивном свечении нанопорошка; в-третьих, о полном соответствии наших наблюдений тем, которые проводятся другими авторами (Souza et al., 1999).

Для того чтобы исключить сочетанную токсичность (от воздействия наноматериала и фототоксичности), все последующие наблюдения проводили без воздействия света, т. е. инкубацию с наночастицами проводили в темноте, а для выявления возможного проявления токсичности использовали микроскопические методы и биохимиче-

ские тесты, исключающие лазерную засветку. Исследование жизнеспособности клеток после инкубации в течение 120 мин с наночастицами, оцененное по окраске пропидиумом йодидом, показывает, что происходит существенное и достоверное снижение выживаемости клеток в сравнении с контролем. В контроле через 120 мин инкубации количество выживших клеток составило 98.5 ± 0.5 %, внесение наночастиц в концентрации 10^{-4} мМ сократило число выживших клеток до 27.0 ± 6.6 %, а в концентрации 10^{-3} мМ — до 19.07 ± 3.34 % (см. таблицу).

Для доказательства фагоцитоза наноразмерных флуорофоров нейтрофильными гранулоцитами проводили исследование процесса поглощения с использованием высококорректного метода АСМ. На рис. 2 представлен процесс образования псевдоподий нейтрофилами при поглощении наночастиц с флуоресцирующим центром Er/Yb.

Образование псевдоподий отмечено через 5 мин после добавления к адгезированным на подложке нейтрофильным гранулоцитам наночастиц в концентрации 10^{-3} мМ. Видоизменения клеток начинались через 30—40 мин после внесения флуорофора в концентрации 10^{-3} мМ (рис. 3). Признаки морфологической деструкции были очевидны: вначале визуализируется истончение мембраны на периферии клетки, затем отмечается выраженный некроз нейтрофильных гранулоцитов. Однако еще до появления признаков выраженного некроза более ранним проявлением токсического действия наночастиц с флуоресцентным центром Er/Yb явилось снижение ригидности мембраны нейтрофильного гранулоцита. Модуль Юнга, характеризующий ригидность клеточной мембраны у нативной клетки и клетки после внесения наночастиц в концентрации 10^{-3} мМ, различался статистически значимо и составил в абсолютных единицах 26.46 ± 2.49 кПа у нативной клетки и 19.07 ± 3.34 кПа у клетки, проинкубированной с наночастицами в течение 20 мин ($P < 0.05$).

Проводили исследование воздействия наноразмерных флуоресцирующих частиц на кислородозависимое и кислородонезависимое звенья при реализации цитотоксической функции нейтрофильного гранулоцита. Для исследования влияния на кислородозависимые метаболические процессы проводили определение выраженности реакций в спонтанном и индуцированном зимозаном НСТ-тестах.

Изменение основных характеристик нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в результате инкубации с наночастицами с флуоресцирующими центрами Er/Yb (НФЦ-Er/Yb)

Исследуемый параметр НГ	Контроль, %	Инкубация нейтрофилов с НФЦ-Er/Yb (10^{-4} мМ), %	Инкубация нейтрофилов с НФЦ-Er/Yb (10^{-3} мМ), %
Выживаемость (инкубации 120 мин)	98.5 ± 0.5	27.0 ± 6.6^a	19.07 ± 3.34^a
Число НСТ-положительных НГ в стимулированном зимозаном НСТ-тесте (инкубации 60 мин)	40.5 ± 12.4	22.0 ± 2.3^a ($t = 2.45$; $n = 6$; $P < 0.05$)	21.5 ± 3.5^a ($t = 2.45$; $n = 6$; $P < 0.05$)
Число НСТ-положительных НГ в спонтанном НСТ-тесте (инкубации 60 мин)	12.8 ± 0.9	9.0 ± 1.8^a ($t = 2.45$; $n = 6$; $P < 0.05$)	8.8 ± 2.0^a ($t = 2.45$; $n = 6$; $P < 0.05$)
Средний цитохимический коэффициент в ЛКТ-тесте (инкубации 60 мин)	1.37 ± 0.70	0.85 ± 0.60^a ($t = 2.57$; $n = 5$; $P < 0.05$)	0.83 ± 0.60^a ($t = 2.57$; $n = 5$; $P < 0.05$)
Активность кислой фосфатазы (инкубации 30 мин)	0.73 ± 0.25	0.30 ± 0.09^a ($t = 3.97$; $n = 14$; $P < 0.05$)	0.40 ± 0.18^a ($t = 2.71$; $n = 14$; $P < 0.05$)
Активность щелочной фосфатазы (инкубации 30 мин)	0.61 ± 0.13	0.41 ± 0.03^a ($t = 3.84$; $n = 15$; $P < 0.05$)	0.37 ± 0.050^a ($t = 3.84$; $n = 14$; $P < 0.05$)
Рецепторозависимая адгезия на С3b (инкубации 30 мин)	33.40 ± 12.5	30.1 ± 5.3 ($t = 0.68$; $n = 15$; $P < 0.05$)	22.4 ± 1.9^a ($t = 2.29$; $n = 14$; $P < 0.05$)

^a Различия между контролем и опытом статистически значимы ($P < 0.05$).

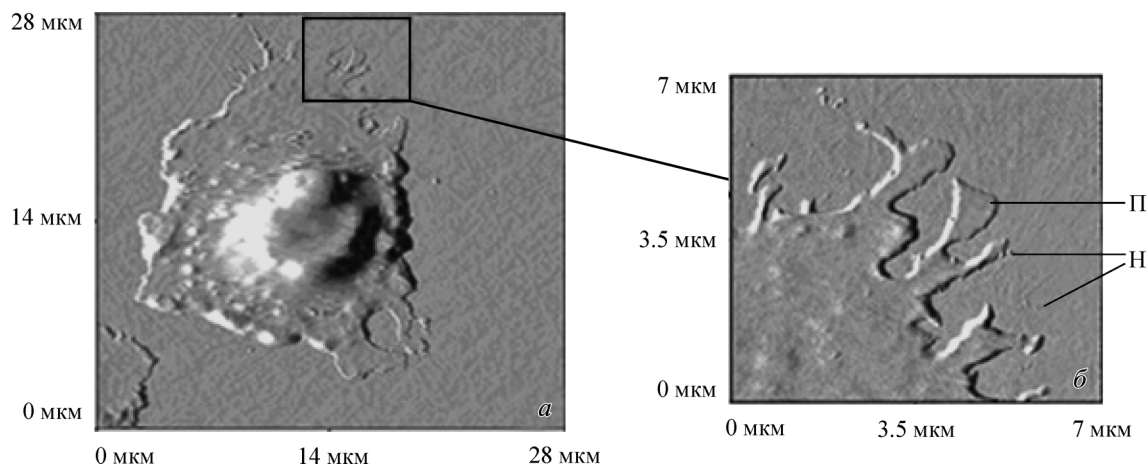


Рис. 2. Образование псевдоподий нейтрофильными гранулоцитами через 10 мин после внесения наночастиц с флуоресцирующими центрами Er/Yb в концентрации 10^{-3} мМ.

б — увеличенный фрагмент, выделенный рамкой на рис. 2, а; П — псевдоподия, Н — наночастица с флуоресцирующими центрами Er/Yb. Изображение получено на атомно-силовом микроскопе SOLVER BIO™ (NT-MDT, Россия) с использованием зондов MSCT-Au (Veeco, США) и обработано в программе SPMLab Analysis Only (Topometrix, США).

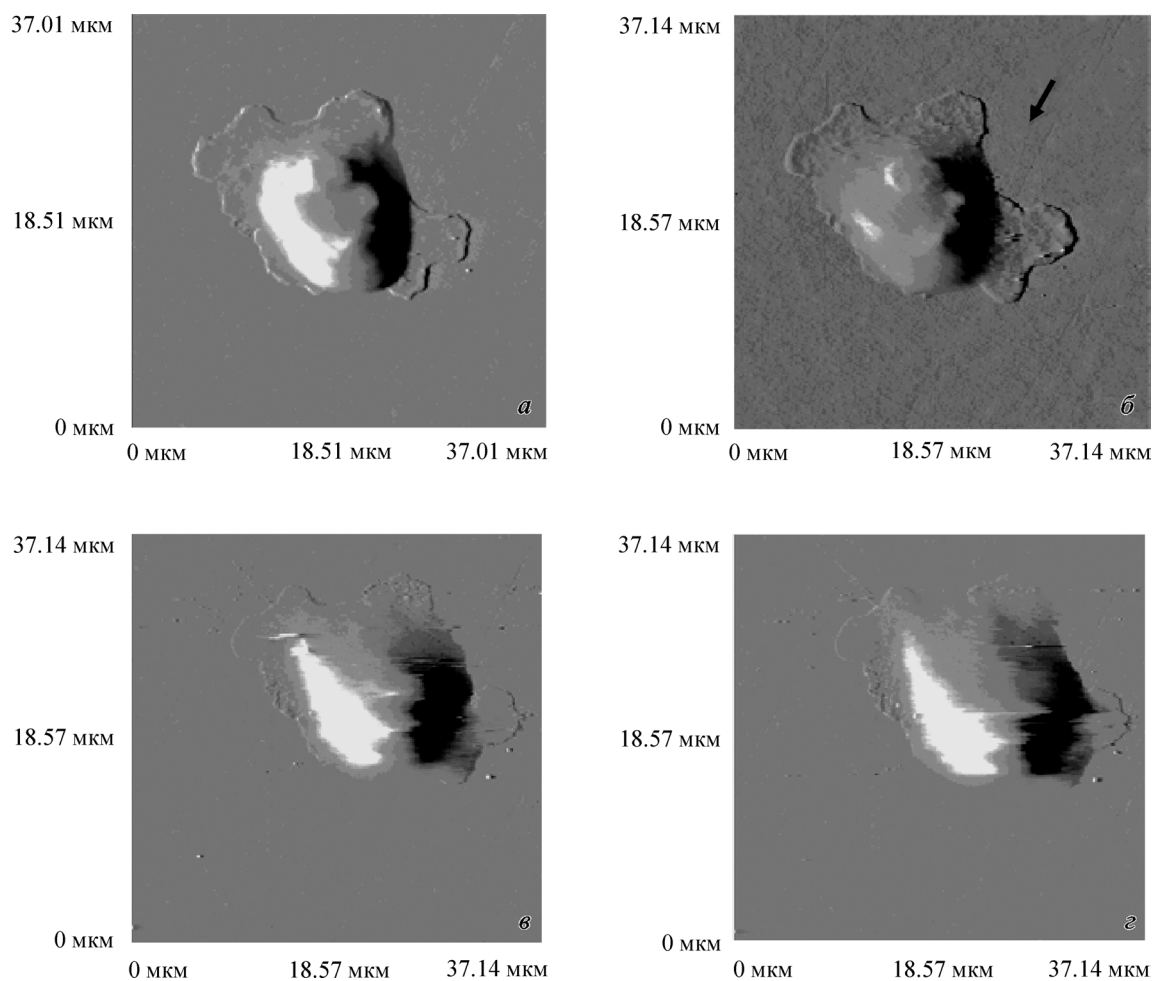


Рис. 3. Некроз нейтрофильных гранулоцитов в результате инкубации их с наночастицами с флуоресцирующими центрами Er/Yb. а — контрольная точка (нативный нейтрофил); б — через 20 мин после внесения наночастиц наблюдается уплощение мембраны по периферии клетки (стрелка); в — через 30—40 мин: истончение уплощенного участка мембраны; г — через 80 мин идет разрушение мембраны, а в последующем нейтрофильный гранулоцит удаляется зондом с поверхности подложки.

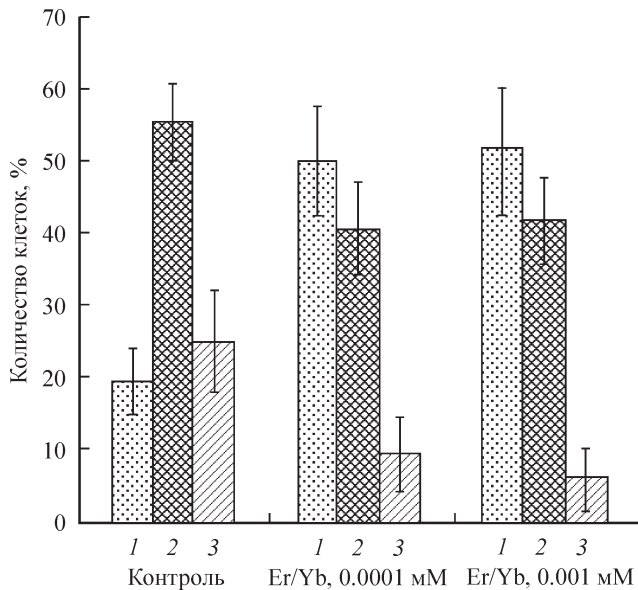


Рис. 4. Дифференцировочный лизосомно-катионный тест.

Доля высокоактивных клеток после инкубации с наночастицами значительно уменьшается (столбик 3, СЦК ≥ 2), доля среднеактивных клеток снижается незначительно (столбик 2, $1 \leq < 2$), а доля низкоактивных клеток значительно возрастает (столбик 1, СЦК ≤ 0.5).

Результаты демонстрируют существенное и достоверное снижение числа НСТ-позитивных гранул и в спонтанном, и в стимулированном НСТ-тесте через 60 мин после начала инкубации (см. таблицу). Представленные данные демонстрируют, что обе концентрации оказывали почти одинаковое ингибирующее влияние на кислородозависимый метаболизм нейтрофильного гранулоцита, однако степень активации клетки здесь была определяющим фактором. В частности, фоновый метаболизм нейтрофила в среднем подавлялся лишь на 30 %, тогда как клетка в состоянии активации в процессе высвобождения активных форм кислорода ингибировалась наночастицами в среднем на 45 %.

Результаты исследования кислородонезависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов в ЛКТ показали, что, как и в случае с кислородозависимыми реакциями, отмечаются практически одинаковые значения подавления кислородонезависимого метаболизма для обеих концентраций наночастиц (см. таблицу). Ингибирование кислородонезависимого метаболизма выявляется не только по суммарным данным СЦК, но и еще более выражено в дифференцировочном ЛКТ-тесте с подсчетом высокоактивных, среднеактивных и низкоактивных клеток. Результаты дифференцировочного теста представлены на рис. 4, на котором видна четко выраженная функциональная диспропорция в содержании лизосомно-катионных гранул нейтрофильных гранулоцитов: количество высокоактивных гранул существенно снижается по сравнению с контролем, в то же время количество низкоактивных гранул резко возрастает.

Исследование влияния на основные ферментные системы нейтрофильного гранулоцита показало, что наблюдается существенное и достоверное подавление активности как щелочной, так и кислой фосфатазы уже после 30 мин инкубации клеток с наночастицами с флуоресцирующим центром Ег/Уб (см. таблицу).

Наиболее стабильным признаком оказалась экспрессия мембранных рецепторов. Известно, что на мемб-

ране нейтрофильных гранулоцитов экспрессируются представители семейства интегринов CD11a/CD18 и CD11b/CD18, являющиеся рецепторами для компонентов С3b и iС3b комплемента (Белоцкий, Авталион, 2008). Функционирование рецепторов можно оценить по адгезии нейтрофилов на С3b-опсонизированном сефадексе (Маянский и др., 1989). Подсчет числа С3b-позитивных гранул показал, что преинкубация нейтрофилов с наночастицами с флуоресцентными центрами Ег/Уб в концентрации 10^{-4} мМ не вызывает достоверного снижения адгезии, тогда как увеличение концентрации до 10^{-3} мМ приводит к достоверному снижению рецепторной активности нейтрофилов (см. таблицу).

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что наночастицы с флуоресцирующими центрами Ег/Уб обнаруживают токсичность в отношении микрофагов. Поглощение наночастиц осуществляется традиционным для нейтрофилов путем — фагоцитозом, о чем свидетельствуют образование псевдоподий и обнаружение наночастиц внутри клеток. Принимая во внимание размер частиц (порядка 100 нм) с учетом их гидродинамического диаметра, такой механизм поглощения представляется единственно возможным. Поскольку фототоксичность была исключена условиями проведения экспериментов, вероятнее всего, токсическое действие наночастиц реализуется за счет индукции образования активных форм кислорода. Существует большое количество работ, свидетельствующих о ведущей роли оксидативного стресса в реализации токсических свойств наноматериалов (Hoet et al., 2004; Nel et al., 2006; Murphy et al., 2008; Senevirathna et al., 2008). О том, что в наших экспериментах отмечается именно такой вариант воздействия наночастиц с флуоресцирующими центрами Ег/Уб на нейтрофильные гранулоциты, косвенно свидетельствуют и снижение упругости клеточных мембран, и некротический вариант клеточной гибели, и подавление мембранозависимых процессов, и резкое ингибирование кислородозависимого метаболизма у активированных клеток (поскольку активация сопровождается образованием собственных активных форм кислорода).

Достаточно трудно определить наиболее уязвимое звено нейтрофильного гранулоцита, поскольку токсическое действие наночастиц с флуоресцирующими центрами Ег/Уб реализуется и в отношении мембранных, и в отношении ферментных систем клетки. Вместе с тем нужно отметить, что токсичность исследуемого вещества сопоставима с одним из наименее токсичных типов квантовых точек, которые были исследованы в наших экспериментах, проводимых параллельно, — CdSeCdSZnS с покрытием polyT/SiO₂-NH₂, поскольку оба этих вещества проявляли токсическую активность в концентрации 10^{-4} мМ.

Полученные нами данные показывают перспективность использования нейтрофильных гранулоцитов в качестве тестовой системы для оценки токсичности наноматериалов, поскольку для этого типа клеток характерно поглощение экзогенных веществ, в том числе и нанометрового масштаба. Важным практическим выводом работы является то, что значимые изменения ригидности мембран появляются еще до видимых морфологических изменений клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-97068 р_Поволжье а) и Федерально-целевой программы ГК № 14.740.11.0456.

Список литературы

- Белоцкий С. М., Авталион Р. Р. 2008. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты. М.: БИНОМ. 240 с.
- Маянский А. Н., Пикуза О. И. 1993. Клинические аспекты фагоцитоза. Казань: Магариф. 192 с.
- Маянский А. Н., Чеботарь И. В., Кобышклина Т. М. 1989. Неоднородность нейтрофилов человека в реакциях неспецифической адгезии. Иммунология. 3 : 55—58.
- Орлова А. И., Орлова М. П., Соловьева Е. М., Логинова Е. Е., Демарин В. Т., Казанцев Г. Н., Самойлов С. Г., Стефановский С. В. 2006. Лантаниды в фосфатах со структурой минерала витлокита [аналог β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$]. Радиохимия. 48 (6) : 504—509.
- Пигаревский В. Е. 1988. Лизосомально-катионный тест. В кн.: Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов. Л. 87—101.
- Плескова С. Н., Звонкова М. Б., Гуцина Ю. Ю. 2005. Исследование морфологических параметров нейтрофильных гранулоцитов методом сканирующей зондовой микроскопии. Морфология. Арх. анат., гистол. эмбриол. 127 : 60—62.
- Подосинников И. В., Нилова Л. Г., Бабиченко И. В. 1981. Метод определения хемотаксической активности лейкоцитов. Лабораторное дело. 8 : 68—70.
- Шубич М. Г., Нагоев Б. С. 1980. Щелочная фосфатаза лейкоцитов в норме и патологии. М.: Медицина. 41 с.
- Шубич М. Г., Нестерова И. В. 1980. О специфичности цитохимического выявления кислой фосфатазы в нейтрофильных лейкоцитах. Лабораторное дело. 3 : 150—154.
- Benhamou R. A., Bessiere A., Wallez G., Viana B., Elatmani M., Daoud M., Zegzouti A. 2009. New insight in the structure-luminescence relationships of $\text{Ca}_9\text{Eu}(\text{PO}_4)_7$. J. Solid State Chem. 182 : 2319—2325.
- Bukharaev A. A., Mozhanova A. A., Nurgazizov N. I., Ovchinnikov D. V. 2003. Measuring local elastic properties of cell surfaces and soft materials in liquid by AFM. In: Physic of low-dimension structures. 31—38.
- Chermont Q. M., Chaneac C., Seguin J., Pelle F., Maitrejean S., Jolivet J.-P., Gourier D., Bessodes M., Scherman D. 2007. Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for *in vivo* imaging. PNAS. 104 : 9266—9271.
- Flahaut E. 2010. Introduction to the special focus issue: environmental toxicity of nanoparticles. Foreword. Nanomedicine. 5 : 949—950.
- Fujioka K., Hiruoka M., Sato K., Manabe N., Miyasaka R., Hanada S., Hoshino A., Tilley R. D., Manome Y., Hirakuri K., Yamamoto K. 2008. Luminescent passive-oxidized silicon quantum dots as biological staining labels and their cytotoxicity effects at high concentration. Nanotechnology. 19 : 1—7.
- Guo G., Liu W., Liang J., He Z., Xu H., Yang X. 2007. Probing the cytotoxicity of CdSe quantum dots with surface modification. Materials Letters. 61 : 1641—1644.
- Hoet P. H. M., Brüske-Hohlfeld I., Salata O. V. 2004. Nanoparticles — known and unknown health risks. J. Nanobiotechnol. 2 : 1—15.
- Lévy M., Lagarde F., Maraloiu V. A., Blanchin M. G., Gendron F., Wilhelm C., Gazeau F. 2010. Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. Nanotechnology. 21 : 1—11.
- Murphy C. J., Gole A. M., Stone J. W., Sisco P. N., Alkila-ny A. M., Goldsmith E. C., Baxter S. C. 2008. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. Accounts of Chem. Res. 41 : 1721—1730.
- Nel A., Xia T. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. Science. 311 : 622—627.
- Senevirathna W., Kiro R., Rosen R., Popov I., Belkin S., Wells M. 2008. CdSe quantum dots induce superoxide stress in engineered biosensor bacteria. Nanotoxicology. 1—12.
- Shiohara A., Hoshino A., Hanaki K., Suzuki K., Yamamoto K. 2004. On the cytotoxicity caused by quantum dots. Microbiol. Immunol. 48 : 669—675.
- Sousa D. F., Zonetti L. F. C., Bell M. J. V., Lebullenger R., Hernandes A. C., Nunes L. A. O. 1999. Er^{3+} : Yb^{3+} codoped lead fluoroindogallate glasses for mid infrared and upconversion applications. J. Appl. Phys. 85 : 2502—2507.

Поступила 19 X 2010

RESEARCH OF BIOCOMPATIBILITY OF NANOPARTICLES WITH FLUORESCENT DOMEN Er/Yb IN THE NEUTROPHILIC GRANULOCYTES SYSTEM

S. N. Pleskova,^{1,2,*} E. N. Gorshkova,¹ E. R. Mikheeva,^{1,2} A. N. Shushunov¹

¹ Research and Education Center for «Physics of solid state nanostructures»
N. I. Labachevsky State University of Nizhni Novgorod
and ² Department of Biotechnologies, Physical and Analytical Chemistry R. Y. Alekseev
Nizhni Novgorod State Technical University;
* e-mail: pleskova@mail.ru

Fluorescent tags are extensively used for the diagnostic, labeling and marking *in vivo* and *in vitro* systems. In this study, fluorescent nanoparticles with Er/Yb lightning center were tested on neutrophilic granulocytes. The main purpose was to identify possible toxic effect. The negative impact of fluorophores on the metabolism of neutrophilic and their enzyme systems, on the receptor-mediated cell responses and on the rigidity of cell membranes was shown. The viability of neutrophils (estimated with the use of propidium iodide) after 2 hours of incubation with the fluorescent nanoparticles in concentrations of 10^{-4} and 10^{-3} mM was 27.0 ± 6.6 and 19.07 ± 3.34 %, respectively.

Key words: nanosized fluorophores, neutrophils granulocytes, viability.