

**КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ НА ОСНОВЕ ФОСФИДА ИНДИЯ (InP):  
ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ ОРГАНИЧЕСКОЙ ОБОЛОЧКИ  
НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ КЛЕТКАМИ  
РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

© *И. К. Литвинов*<sup>1,2</sup> *Т. Н. Беляева*<sup>1</sup> *А. В. Салова*<sup>1,\*</sup> *Н. Д. Аксенов*<sup>1</sup>  
*Е. А. Леонтьева*<sup>1</sup> *А. О. Орлова*<sup>2</sup> *Е. С. Корнилова*<sup>1-4,\*</sup>

<sup>1</sup> *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,*

<sup>2</sup> *С.-Петербургский университет информационных технологий, механики и оптики,  
Санкт-Петербург, 199034,*

<sup>3</sup> *С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251,*

*и* <sup>4</sup> *С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034;*

*\* электронный адрес: elena.kornilova@gmail.com; avsalova@gmail.com*

Полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы, получившие название квантовых точек (КТ), на основе кадмия (CdSe и CdTe) привлекают внимание биологов благодаря их широкому диапазону эмиссии в видимом свете, высокому квантовому выходу и фотостабильности. Тем не менее их применение ограничивается из-за возможной токсичности кадмия. Действительно, существует вероятность утечки металла из ядер КТ в результате повреждения как неорганических, так и органических слоев оболочек, покрывающих КТ. Альтернативой кадмиевым КТ является использование наноструктур, имеющих в качестве ядра фосфид индия (InP), также излучающих в видимой области спектра. В настоящее время существует очень мало работ по применению этих частиц в биологии. В настоящем исследовании проведен сравнительный анализ спектрально-люминесцентных свойств двух образцов КТ InP/ZnS, покрытых ПЭГ с функциональными группами –COOH или –NH<sub>2</sub>. Полученные данные сопоставлены с характеристиками КТ CdSe/ZnS, покрытых ПЭГ без реактивных групп. Фотофизические характеристики всех КТ в водном растворе соответствовали заявленным производителями. Также было обнаружено, что фотолюминесценция всех видов КТ при pH 4.0 ниже, чем при pH 7.4, при этом ее падение было минимальным в случае КТ-ПЭГ-COOH. При изучении поглощения всех трех видов КТ макрофагами J774 установлено, что спектры флуоресценции КТ не меняются по сравнению с таковыми в растворе. Обнаружено, что все три вида КТ накапливаются в клетках через 24 ч культивирования, однако если КТ-NH<sub>2</sub> и КТ без реактивных групп выявляются в основном в везикулоподобных дискретных структурах, то КТ-COOH оказывается диффузно распределенным по цитоплазме, что свидетельствует о разных механизмах взаимодействия с клеточными мембранами. В нефагоцитирующих клетках линии HeLa КТ ведут себя аналогично, однако общий уровень флуоресценции клеток существенно ниже. Анализ накопления иодида пропидия показал, что во всех случаях доля погибших клеток HeLa через 24 ч не превышала 10 %. Таким образом, продемонстрировано, что нетоксичные КТ на основе InP могут использоваться как эффективный инструмент для биологических исследований.

Ключевые слова: квантовые точки CdSe и InP, фотолюминесценция, макрофаги J774, клетки HeLa, pH.

Принятые сокращения: ИФ — интенсивность фотолюминесценции, КТ — квантовые точки, ПЭГ — полиэтиленгликоль, PI — иодистый пропидий.

Развитие флуоресцентных методов в биологических исследованиях дало мощный толчок к поиску и созданию флуорофоров, в частности таких как квантовые точки (КТ), обладающие уникальными фотофизическими свойствами. Коллоидные КТ — полупроводниковые нанокристаллы с размером ядра в диапазоне 2—10 нм, состоящие из молекул на основе элементов II—VI или III—V групп периодической системы, таких как CdSe, CdTe, CdS, ZnS, InP, InAs и др. В общем случае они покрыты монослоем стабилизатора (оболочкой) из органических молекул (Bruchez et al., 1998). КТ привлекают исследователей в

силу таких свойств, как большой эффективный Стоксов сдвиг, высокий квантовый выход, узкие спектры фотолюминесценции, широкие спектры поглощения, высокие молярные коэффициенты экстинкции и высокая фотостабильность (Rosenthal et al., 2011; Esteve-Turrillas, Abad-Fuentes, 2013). Кроме того, при универсальной для всех КТ полосе возбуждения в УФ-области длина волны излучения конкретной наночастицы зависит не только от ее химического состава, но и от размера ядра. Это чрезвычайно удобно, в частности при визуализации нескольких мишеней одновременно как в клетках, так и на животных.

Наиболее широко используемыми являются КТ на основе CdSe и CdTe благодаря их широкому диапазону эмиссии в видимом свете, высокому квантовому выходу фотолюминесценции и хорошо воспроизводимой технологии синтеза (Dabbousi et al., 1997; Kim et al., 2003; Zhong et al., 2012). Однако в исследовательском сообществе существуют определенные опасения в связи с высокой токсичностью составляющих их элементов, в особенности кадмия, и возможностью их перехода из состава КТ в окружающую среду (Derfus et al., 2004; Kirchner et al., 2005; Cho et al., 2007). В большинстве случаев для увеличения квантового выхода кадмиевое ядро покрывают слоем ZnS, что должно препятствовать также и утечке ионов кадмия; однако как этот слой, так и органическая оболочка, обеспечивающая водорастворимость КТ, могут разрушаться или повреждаться при фотолизе, окислении или низком значении pH (Aldana et al., 2001; Derfus et al., 2004; Aldana et al., 2005; Bentzen et al., 2005; Uyeda et al., 2005). Так, в процессе окисления КТ на основе кадмия внутри клеток был продемонстрирован выход  $Cd^{2+}$  в цитоплазму с последующим присоединением к различным внутриклеточным белкам через сульфгидрильные группы (Kirchner et al., 2005; Smith et al., 2008). Хотя такие взаимодействия могут иметь цитотоксический эффект (Mo et al., 2017), существующие данные относительно токсичности Cd-содержащих КТ достаточно противоречивы. Поскольку обсуждаются перспективы биомедицинского применения КТ, любые риски должны быть минимизированы. Очевидно, что принципиальным путем решения этой проблемы является использование «бескадмиевых» КТ, например на основе фосфида индия (InP) (Young et al., 2012). Такие КТ излучают в видимой области спектра (500—800 нм). В настоящее время существует очень малое число работ по применению этих частиц в биологии (Liu et al., 2013; Soenen et al., 2014).

Синтез КТ, как правило, проводится в органических растворителях, и для использования в биологических средах их покрывают оболочкой из амфифильных соединений. Эта оболочка не только делает КТ водорастворимыми, но и дает возможность присоединять к ним различные лиганды или антитела для последующего специфического мечения белков-мишеней (Bentzen et al., 2005; Uyeda et al., 2005). Одним из наиболее распространенных материалов является полиэтиленгликоль (ПЭГ), который может нести различные реактивные группы, а также предотвращает агрегацию КТ и минимизирует их неспецифическое взаимодействие с клетками.

Не исключена возможность того, что заряд и другие свойства конкретных реактивных групп могут влиять как на оптические свойства функционализированной КТ, так и на особенности ее взаимодействия с клетками. В связи с вышеизложенным необходим сравнительный анализ свойств КТ на основе InP и CdSe, для того чтобы оценить адекватность применения индиевых КТ как наиболее перспективной альтернативы кадмиевым КТ для отслеживания биологических процессов и доставки грузов в клетки, а также для возможного применения *in vivo*.

Следует подчеркнуть, что интерес с точки зрения как фундаментальных исследований, так и перспектив практического применения в области биологии и медицины представляют не точки с реактивными группами, а наноструктуры, к которым через эти группы присоединяются специфические антитела или стрептавидин, обеспечивающие возможность адресной доставки таких комплексов в определенные типы клеток. Однако всегда следует учи-

тывать, что не все группы на поверхности КТ могут быть вовлечены в формирование связей с лигандами, в то время как группы, оставшиеся свободными, при определенных условиях могут способствовать неспецифическим, независимым от природы адресных молекул взаимодействиям с клеткой. Таким образом, анализ поведения КТ с реактивными группами весьма актуален.

В настоящей работе сравнивали оптические свойства коммерческих образцов КТ на основе CdSe/ZnS и InP/ZnS в водных растворах и в клетках. КТ CdSe/ZnS были покрыты оболочкой из ПЭГ, КТ InP/ZnS были покрыты оболочкой из ПЭГ с реактивными группами  $-NH_2$  или  $-COOH$ . Клеточными моделями служили клетки эпителиальной карциномы человека линии HeLa и макрофагоподобные клетки линии J774, способные к фагоцитозу.

## Материал и методика

Анализ спектрально-люминесцентных свойств КТ. В работе использовали три вида КТ: 1) КТ на основе CdSe/ZnS, покрытые ПЭГ без реактивных групп (КТ-ПЭГ); 2) КТ на основе InP/ZnS, покрытые ПЭГ с  $NH_2$ -группами (КТ-ПЭГ- $NH_2$ ); 3) КТ на основе InP/ZnS, покрытые ПЭГ с  $COOH$ -группами (КТ-ПЭГ- $COOH$ ). Максимум флуоресценции КТ-ПЭГ составлял 655 нм (Invitrogen, США), максимумы флуоресценции КТ-ПЭГ- $NH_2$  и КТ-ПЭГ- $COOH$  — 640 нм (Mesolight, Китай). Спектрально-люминесцентные свойства КТ исследовали методами стационарной оптической спектроскопии. Анализировали растворы КТ в воде или PBS (pH 7.4 или 4.0) в концентрациях 10 и 20 нМ. Спектры поглощения и фотолюминесценции растворов КТ регистрировали соответственно на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония) и спектрофлуориметре Cary Eclipse (Aligent, США). Для измерения времен затухания люминесценции применяли лазерный сканирующий люминесцентный микроскоп MicroTime 100 (PicoQuant, Германия). В настоящей работе распады люминесценции наноструктур были зарегистрированы с использованием интерференционных оптических фильтров, прозрачных в областях на 640, 655 и 670 нм для регистрации люминесценции CdSe КТ и на 600, 640 и 680 нм для регистрации люминесценции InP КТ.

Культивирование клеток. Макрофагоподобные клетки асцита мыши линии J774 и клетки карциномы человека линии HeLa (Российская коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург) культивировали во флаконах 25 см<sup>2</sup> (Nunc, США) в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 20 мМ глюкозы, 10 % сыворотки крови плодов коровы и 0.1 % гентамицина, в атмосфере 5 %  $CO_2$  при 37 °С. Клетки для экспериментов сеяли на чашки Петри (Nunc, США) или на покровные стекла в чашках Петри. Эксперименты проводили через 48 ч при достижении клетками 60—70 % монослоя. Все КТ в необходимых концентрациях добавляли в среду культивирования клеток на 24 ч.

Конфокальная микроскопия. Исследования проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Olympus FV3000 (Япония). Использовали иммерсионный объектив 60/1.42. Флуоресценцию всех КТ возбуждали лазером 405 нм и регистрировали в областях 625—685 (для CdSe/ZnS) и 600—680 (для InP/ZnS) нм. Изображения снимали в спектральном канале, соответствующем области регистрации флуоресценции конкрет-

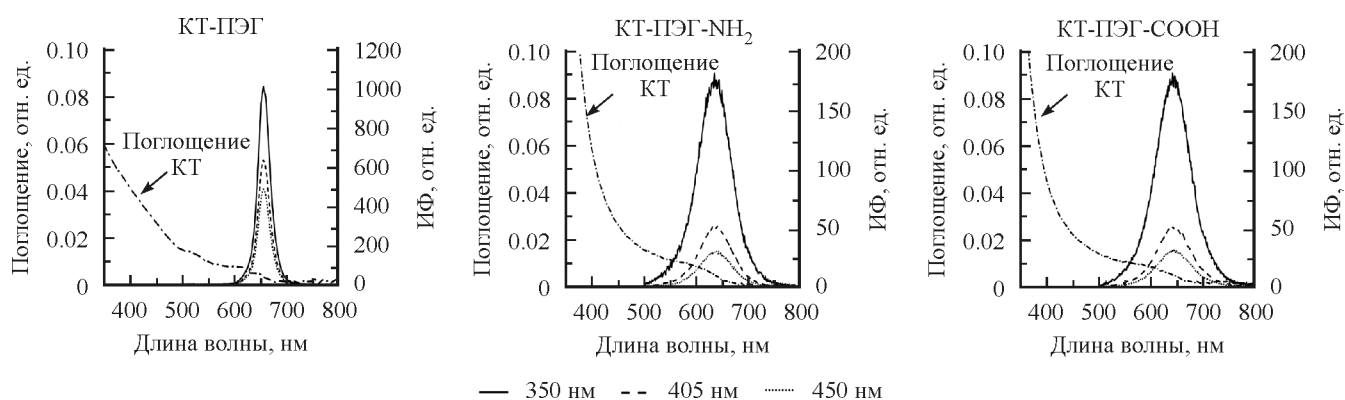


Рис. 1. Спектрально-оптические свойства водных растворов КТ на основе CdSe/ZnS (КТ-ПЭГ) и КТ на основе InP/ZnS (КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-СООН).

Представлены спектры поглощения и фотолюминесценции растворов КТ-ПЭГ (10 нМ), КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> (20 нМ) и КТ-ПЭГ-СООН (20 нМ) в воде. Поглощение на длине волны 350 нм. Люминесценцию возбуждали светом с длинами волн 350, 405 и 450 нм. Максимум флуоресценции КТ-ПЭГ — 655 нм, КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-СООН — 640 нм. ИФ — интенсивность фотолюминесценции.

ных КТ, и с помощью метода дифференциально-интерференционного контраста (DIC) в проходящем свете. Регистрировали одиночные срезы или серийные Z-серии с шагом 0.5 мкм (10—20 последовательных оптических срезов). Кроме того, флуоресценцию КТ исследовали с помощью режима спектрального сканирования (Mode/хул) в интервале 525—700 нм с шагом 5 нм.

Анализ флуоресценции клеточной популяции. Суспензию контрольных и культивированных с КТ клеток анализировали на цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США) при максимальной скорости подачи образца (1 мкл/с) в течение 100 с. Сбор данных осуществляли при возбуждении лазером 405 нм, используя фильтр 660/20 BP. Полученные данные анализировали с помощью программы CytExpert 2.0.0.152 (Beckman Coulter, США).

Оценка выживаемости клеток. К суспензии клеток контрольных и культивированных с КТ клеток добавляли 50 мкг/мл иодистого пропидия (PI; Sigma) и анализировали методом проточной цитофлуориметрии на цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США) при максимальной скорости подачи образца (1 мкл/с) в течение 100 с. Сбор данных осуществляли на основе оптических характеристик — флуоресценция PI против прямого светорассеяния в логарифмической шкале (FSLOG/FL4LOG).

Статистическая обработка данных. Все данные были получены как минимум из трех независимых экспериментов. При исследовании на конфокальном микроскопе для каждого случая просматривали не менее 4 полей (около 15—20 клеток). Изображения для презентации обрабатывали в Adobe Photoshop 5.0. Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ (National Institute of Health, США). Статистическую обработку данных проводили с использованием Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, США). Графики построены с помощью программы OriginPro 2016, гистограммы — с помощью Microsoft Office Excel 2007.

## Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ оптических свойств КТ на основе InP. Использовали два вида водорастворимых КТ InP/ZnS, покрытых ПЭГ и имею-

щих максимум флуоресценции при 640 нм, производства фирмы Mesolight (Китай). Поверхность всех КТ, по данным производителя, на 60—80 % покрыта ПЭГ, который содержит около 80 % OH-групп. При этом один вид КТ содержит еще около 20 % COOH-групп (КТ-ПЭГ-СООН), а второй — около 20 % NH<sub>2</sub>-групп (КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub>) (<http://mesolight.com/e/list.php?classid=27>). Для сравнения оптических свойств КТ использовали еще КТ на основе CdSe/ZnS (Invitrogen, USA), имеющие максимум флуоресценции при 655 нм и покрытые слоем ПЭГ, который не содержит реактивных функциональных групп (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q21021MP>), что минимизирует неспецифические взаимодействия с биологическим окружением (Беляева и др., 2009).

В первой серии экспериментов были исследованы спектрально-люминесцентные свойства трех видов КТ в воде. На рис. 1 представлены спектры поглощения и фотолюминесценции КТ на основе CdSe/ZnS (КТ-ПЭГ, 10 нМ) и на основе InP/ZnS (КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-СООН, 20 нМ). Видно, что полоса поглощения у всех трех видов КТ одинаково широкая, однако КТ InP/ZnS интенсивнее поглощают в УФ-части спектра. Кроме того, длина волны 625 нм соответствует первой полосе экситонного поглощения для CdSe/ZnS КТ-ПЭГ, а 600 нм — для InP/ZnS КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-СООН. Максимум люминесценции используемых нами препаратов CdSe/ZnS КТ-ПЭГ находится на 655 нм, для КТ InP/ZnS — на 640 нм, как и заявлено производителями. В спектре люминесценции не наблюдали дополнительных полос, поэтому тип люминесценции можно отнести к экситонному. Пики люминесценции во всех случаях симметричны, но ширина пика на половине его высоты для CdSe/ZnS КТ-ПЭГ составляет 30 нм (рис. 1), в то время как для InP/ZnS КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-СООН она оказалась равной 80 нм (рис. 1), что превышает величину, заявленную производителем (60 нм). Падение интенсивности флуоресценции по мере увеличения длины волны возбуждающего света существенно больше в случае КТ InP/ZnS по сравнению с КТ CdSe/ZnS, что отражает различия в характере кривой поглощения.

Диаметр ядра КТ и коэффициенты экстинкции КТ CdSe/ZnS вычисляли по методу, описанному Пенгом (Yu et al., 2003). Для вычисления тех же параметров КТ

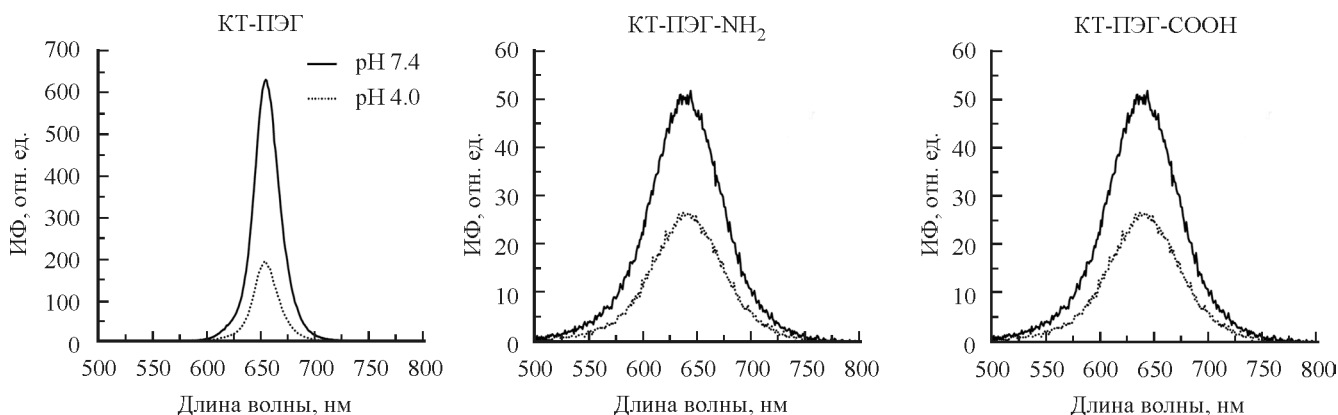


Рис. 2. Изменение интенсивности фотолюминесценции КТ-ПЭГ (10 нМ), КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> (20 нМ) и КТ-ПЭГ-COOH (20 нМ) в растворе PBS при повышении его кислотности.

Люминесценцию возбуждали светом с длиной волны 405 нм. Значения pH раствора 7.4 и 4.0. Обозначения те же, что и на рис. 1.

InP/ZnS использовали методику Янга (Yang et al., 2015). Эти методы основаны на анализе спектрально-люминесцентных характеристик флуорофоров и учитывают то обстоятельство, что различающиеся по составу КТ с определенной организацией электронных уровней имеют разные зависимости положения пика экситонного поглощения от размера частицы. Такой подход к оценке диаметра ядра является общепринятым, и согласно ему диаметр ядра КТ CdSe/ZnS составляет 5 нм, а КТ InP/ZnS — 4.5 нм, коэффициент экстинкции —  $5.5 \cdot 10^5$  и  $3.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  соответственно. Квантовый выход в воде для КТ CdSe/ZnS составляет 31 %, а для обоих видов КТ InP/ZnS — около 5 %. При длине волны возбуждающего света 350 нм максимальное значение интенсивности фотолюминесценции для КТ на основе InP в концентрации 20 нМ оказалось в 5 раз ниже, чем для КТ на основе CdSe в концентрации 10 нМ, что объясняется в основном разницей квантовых выходов.

Влияние pH на свойства КТ. Несмотря на то что ядро КТ в большинстве случаев покрывают оболочками, защищающими их от фотовыгорания, ряд исследований показывает, что люминесценция фотостабильных КТ может подвергаться воздействию окружающих факторов, таких как pH (Gao et al., 2002; Tomasulo et al., 2006), присутствие различных ионов (Boldt et al., 2006; Durisic et al., 2011; Hines, Kamat, 2014), температура (Walker et al., 2003; Wuister et al., 2004; Biju et al., 2005), электрическое поле (Muller et al., 2005) и др.

Возможные пути поступления КТ в клетку зависят от размера и свойств их поверхности. Так, небольшой размер КТ (до 10—15 нм) в ряде случаев делает возможным их проникновение непосредственно через плазматическую мембрану, тогда как КТ большего размера могут попадать внутрь клетки только в составе эндосом. В результате эндоцитированные КТ оказываются в окружении, различающемся, в частности, по значению pH. Так, например, pH цитоплазмы примерно 7.2—7.4. В эндосомном компартменте происходит постепенное закисление до значений pH, равных 4.5—4.0. Чтобы оценить влияние эндосомального окружения на люминесцентные свойства квантовых точек, во второй серии экспериментов КТ на основе InP (20 нМ) помещали в буферные системы с pH 7.4 и 4.0 (стандартный PBS и PBS, подкисленный HCl). Для сравнения использовали КТ на основе CdSe в концентрации 10 нМ. Важно отметить, что все КТ,

покрытые ПЭГ, проявляют хорошую растворимость в широком диапазоне pH — от 4 до 11.

На рис. 2 представлены спектры фотолюминесценции КТ-ПЭГ, КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-COOH, снятые при pH 4.0 и 7.4. Анализ спектров показывает, что при изменении pH положение максимума фотолюминесценции всех видов КТ не смещается. При кислом значении pH интенсивности фотолюминесценции снижаются независимо от типа функциональных групп на поверхности оболочки, при этом самое сильное гашение наблюдается в случае CdSe/ZnS КТ-ПЭГ. Действительно, по данным спектрально-люминесцентного анализа, квантовый выход КТ CdSe при pH 7.4 и 4.0 составил 31 и 8 % соответственно. Таким образом, квантовый выход при pH 4.0 упал на 74 %. Однако в случае КТ InP максимальная интенсивность фотолюминесценции КТ-ПЭГ-COOH уменьшается на 19.4 %, а уменьшение фотолюминесценции КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> достигает 52 %. По результатам спектрально-люминесцентного анализа были оценены квантовые выходы фотолюминесценции нанокристаллов. Если при нейтральном pH отмечается сходное значение квантового выхода люминесценции обоих типов КТ InP (4.5 % для КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и 5.6 % для КТ-ПЭГ-COOH), в случае кислого значения pH квантовый выход падает до 2.9 и 4.4 % соответственно. Продемонстрированная нами тенденция совпадает с результатами других исследований на КТ, покрытых и другими оболочками. Так, сообщалось об аналогичном эффекте при изучении КТ CdSe, солубилизированных меркаптоуксусной кислотой: авторы обнаружили падение квантового выхода люминесценции на 80 % при низком значении pH (Liu et al., 2007). Другие авторы (Soenen et al., 2014) показали, что флуоресценция КТ на основе InP/ZnS, покрытых 3-меркаптопропионовой кислотой (Mesolight, Китай), при pH 4.5 на 20 % ниже, чем при pH 7.4. При этом важно отметить, что высокие значения интенсивности флуоресценции авторы наблюдали в течение 5 сут даже при pH 4.5, что свидетельствует о высокой стабильности КТ InP/ZnS.

Анализ кинетики затухания люминесценции КТ с помощью лазерного сканирующего люминесцентного микроскопа MicroTime 100 (PicoQuant, Германия) позволяет выявить изменения степени агрегации всех образцов КТ. Оказалось, что все растворы КТ изначально (pH 7.4) содержат некоторое количество агрегатов, причем КТ-ПЭГ-COOH в большей степени склонны к агрегации.



При pH 4.0 обнаруживается существенная агрегация только КТ-ПЭГ-СООН (данные не приводятся). Наименьшее гашение флуоресценции КТ-ПЭГ-СООН при низком значении pH (рис. 2) свидетельствует о том, что общее количество способных к агрегации частиц в составе препаратов мало и не вносит существенного вклада в изменения квантового выхода люминесценции.

Феномен падения люминесценции с изменением кислотности раствора может быть объяснен рядом причин. Так, например, предполагается (Durisic et al., 2011), что неорганическая оболочка КТ, представленная в нашем случае ZnS, медленно ионизируется в присутствии протонов и кислорода, в результате чего нарушается ее структура. Предполагается, что появляющиеся при этом ионы  $S^{2-}$  и  $Zn^{2+}$ , оставаясь на поверхности КТ, действуют как дырочные и электронные ловушки, соответственно тем самым уменьшая интенсивность фотолюминесценции. Формирование новых дефектных состояний, которые являются центрами безызлучательной релаксации электронного возбуждения, могут изменять безызлучательные скорости релаксации, что влияет на характеристики фотолюминесценции КТ, такие как интенсивность фотолюминесценции, блиннинг и др.

Кроме того, падение интенсивности фотолюминесценции при кислом значении pH можно объяснить нарушением взаимодействия между органической оболочкой (в данном случае ПЭГ) и поверхностными катионами неорганической оболочки КТ, которое можно рассматривать как особый тип координационной связи (Aldana et al., 2005). Ионы водорода могут конкурировать за поверхностные лиганды с нанокристаллами, приводя к отсоединению лигандов с поверхности КТ и как следствие — к нарушению их водорастворимости с последующей агрегацией. И наоборот, при щелочном pH наличие ионов  $OH^-$  создает благоприятные условия для установления координационной связи между лигандами и поверхностью КТ, что в свою очередь препятствует агрегации КТ (Avellini et al., 2013). Очевидно также, что заряд реактивных поверхностных групп ПЭГ, изменяющийся при увеличении концентрации протонов, может давать вклад в общее изменение оптических свойств.

Таким образом, все компоненты функционализированной КТ (ядро, неорганическая оболочка и оболочка из ПЭГ с ее реактивными группами) вносят свой вклад в реакцию на закисление, и с этой точки зрения каждый вид КТ должен оцениваться по этому параметру индивидуально.

Взаимодействие КТ, содержащих разные реактивные группы, с культивируемыми клетками. В третьей части работы изучали эффективность проникновения КТ на основе CdSe и InP в фагоцитирующие (J774) и нефагоцитирующие (HeLa) клетки, а также характер внутриклеточной локализации КТ в них через 24 ч после добавления наночастиц.

Макрофагоподобные клетки как профессиональные фагоциты способны поглощать крупные, размером в несколько микрометров, частицы. Таким образом, размер функционализированных КТ (15—20 нм) не должен быть препятствием для их поступления в фагосомы клеток J774. Действительно, микрофотографии клеток, культивировавшихся 24 ч при 37 °C в присутствии КТ в концентрации 20 нМ (рис. 3, а), показывают, что все три вида КТ — КТ-ПЭГ, КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-СООН — поглощаются клетками за 24 ч, но с разной эффективностью. При этом обнаружены существенные различия в локали-

зации метки: если КТ-ПЭГ и КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> выявляются в подавляющем большинстве в дискретных везикулоподобных структурах, с наибольшей степенью вероятности являющихся фагосомами, то для КТ-ПЭГ-СООН характерно более диффузное распределение с единичными яркими структурами. Такое распределение характерно для цитоплазматической локализации. Оно может быть результатом как прямого проникновения КТ в клетку через плазматическую мембрану, так и при дестабилизации мембран фагосом и выходу интернализированных КТ в цитоплазму из эндосомных везикул. Для точного определения пути поступления таких КТ в клетку необходимы дополнительные эксперименты, однако уже на основании полученных данных можно утверждать, что характер взаимодействия с клеткой определяется не природой ядра наночастицы, а свойствами ее поверхности. Также надо отметить, что при наших экспериментальных условиях КТ обнаруживаются только внутри клетки. Все три вида наночастиц не обнаружены в ассоциированном с плазматической мембраной виде. Ранее на культивируемых макрофагах мы показали, что взаимодействие КТ-ПЭГ с плазматической мембраной имеет место в первые часы инкубации, после чего все ассоциированные КТ интернализуются и через 24 ч находятся в лизосомах (Беляева и др., 2009).

Важно выяснить, меняется ли характер флуоресценции КТ после попадания в биологическое окружение по сравнению с флуоресценцией КТ в растворе. Для этого было проведено спектральное сканирование конгломератов КТ в клетках. На рис. 3, б представлены репрезентативные спектры флуоресценции КТ-ПЭГ, КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-СООН. Видно, что максимумы флуоресценции соответствуют максимумам флуоресценции в водных растворах (для сравнения спектры, представленные на рис. 1, нормированы по максимальному значению флуоресценции в каждом случае и показаны на рис. 3, б). Разница в ширине пика на половине высоты между КТ InP и CdSe, выявленная в водных растворах, сохраняется и при внутриклеточной локализации КТ. В отличие от водного раствора во всех трех случаях в клетках выявляется относительно небольшая базальная флуоресценция, за которую, возможно, ответственна собственная флуоресценция клеточных белков. Необходимо также отметить, что, несмотря на меньший по сравнению с КТ CdSe/ZnS квантовый выход, частицы на основе InP/ZnS хорошо идентифицируются в везикулярных структурах клеток.

Поскольку оптические свойства КТ на основе CdSe и InP сходны в растворах и в биологических объектах, в дальнейшем мы сосредоточились на изучении поступления в клетки КТ на основе InP для анализа влияния реактивных групп. Для количественной оценки накопления их макрофагами J774 использовали проточную цитометрию. Анализ клеточной популяции через 24 ч после культивирования с КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-СООН показал увеличение флуоресцентного сигнала по сравнению с контрольными клетками (без КТ) (рис. 4, а). Учитывая данные конфокальной микроскопии, можно полагать, что увеличение флуоресценции клеточной популяции после взаимодействия с КТ связано с присутствием КТ внутри клеток, а не с возможным прикреплением агрегатов КТ на их поверхности. Несмотря на то что клетки J774 являются профессиональными фагоцитами и способны осуществлять неспецифичный захват макромолекулярных комплексов, наблюдается разница между поглощением КТ-ПЭГ-СООН и КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub>. Флуоресценция клеточ-

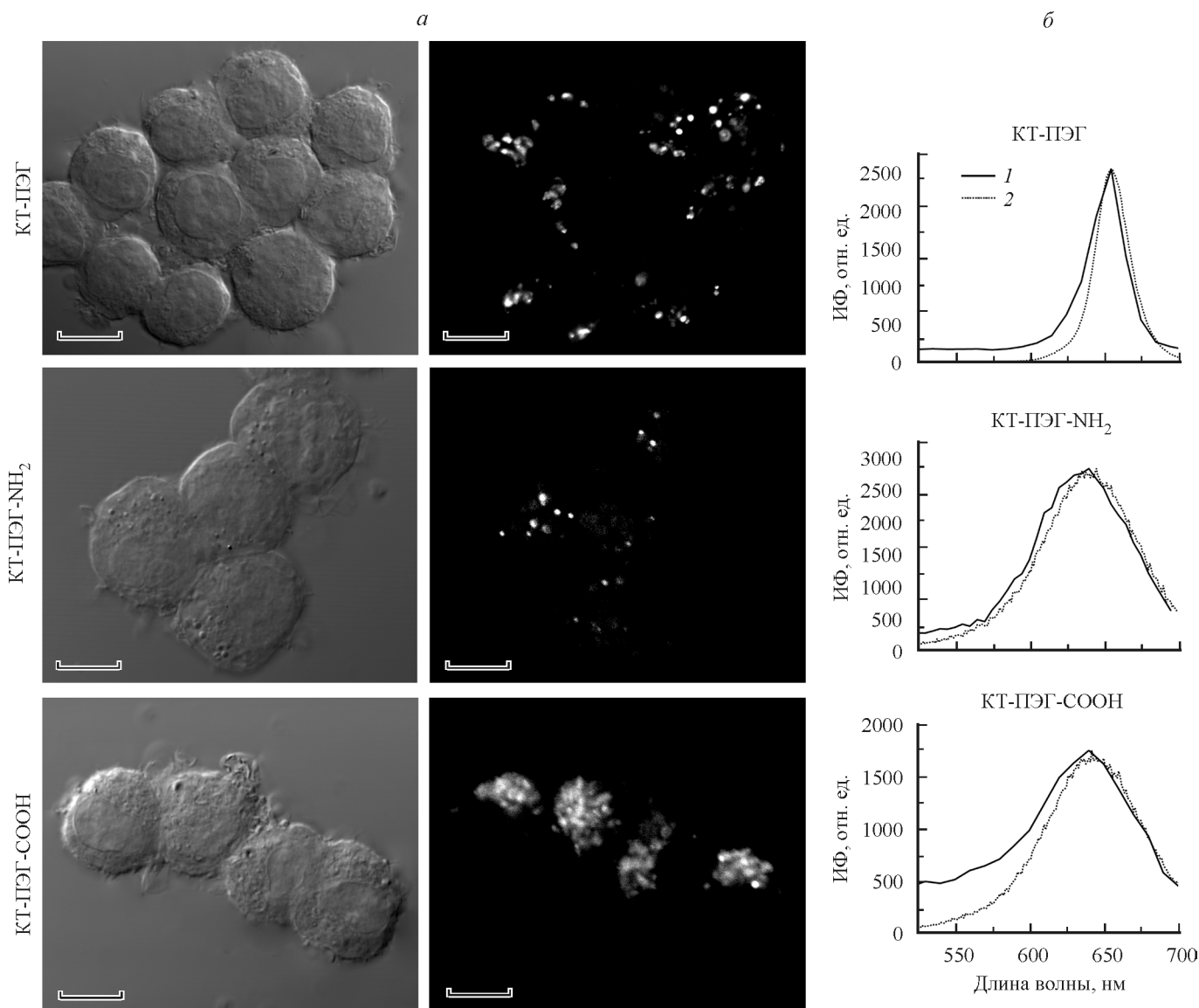


Рис. 3. Поглощение КТ-ПЭГ (20 нМ), КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> (20 нМ) или КТ-ПЭГ-COOH (20 нМ) макрофагоподобными клетками J774.

Клетки культивировали совместно с КТ в течение 24 ч. *а* — дифференциально-контрастные (левый ряд) и конфокальные (правый ряд) изображения клеток при возбуждении лазером 405 нм; *б* — спектры флуоресценции КТ, полученные на конфокальном микроскопе при спектральном сканировании конгломератов КТ в клетках (1), и нормированные спектры этих же КТ в растворе PBS при pH 7.4, полученные на спектрофлуориметре (2). Приведены репрезентативные данные из 3 независимых экспериментов. Обозначения те же, что и на рис. 1. Масштабные отрезки — 10 мкм.

ной популяции относительно контроля для КТ-ПЭГ-COOH увеличивается на 179 %, для КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> — на 55 % (рис. 4, б). Учитывая более сильный уровень гашения КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> в кислых структурах, реальное различие между накоплением этих наноструктур в клетке и КТ-ПЭГ-COOH может быть не таким значительным, однако для более точной оценки величины «ошибки» необходимы дополнительные эксперименты.

Далее влияние реактивных групп -COOH и -NH<sub>2</sub> в составе КТ на проникновение в клетки, не обладающие фагоцитарной способностью, было исследовано на клетках HeLa (рис. 5). Эти клетки способны упаковывать в эндосомы частицы размером до 50 нм в диаметре, таким образом, можно ожидать накопления исследуемых КТ в клетки этой линии. Однако в отличие от макрофагов через 24 ч постоянного присутствия КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> лишь единичные клетки HeLa содержали немногочисленные

везикулоподобные неяркие флуоресцирующие структуры. Эти результаты могут свидетельствовать о низком уровне взаимодействия неадресных КТ, несущих аминогруппы, с плазматической мембраной клеток HeLa и соответственно низким уровнем их интернализации. Хотя эффект гашения флуоресценции этих КТ в лизосомах также необходимо учитывать, в пользу первого предположения говорят и ранее полученные нами данные (Беляева и др., 2009) для КТ-ПЭГ (CdSe/ZnS), тоже не интернализуемых клетками эпителиальной природы. В то же время конфокальная микроскопия показала, что КТ-ПЭГ-COOH выявляются в большом количестве клеток, при этом диффузный характер их локализации также совпадает с таковым в макрофагах J774. Проточная цитометрия подтверждает преимущественное накопление КТ-ПЭГ-COOH, поскольку флуоресценция клеточной популяции относительно контроля для КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub>

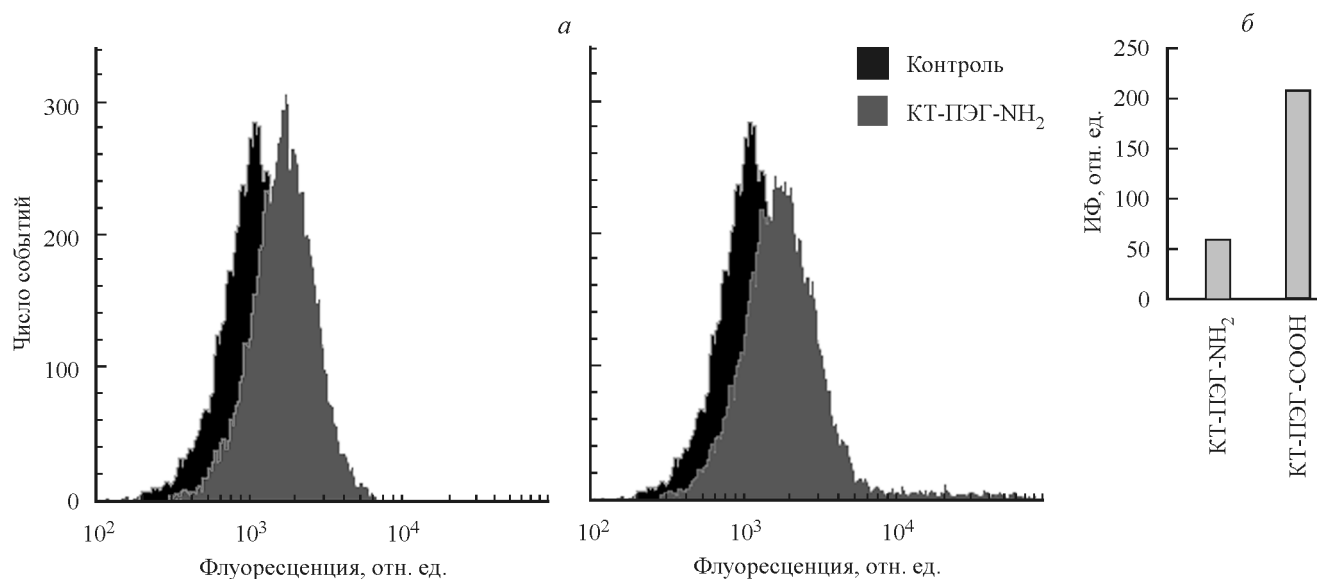


Рис. 4. Накопление КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-COOH в концентрации 30 нМ в макрофагах J774 через 24 ч совместного культивирования. Проточная цитометрия.

а — гистограммы, показывающие изменение интенсивности флуоресценции (ИФ) клеточной популяции. Контроль — культивирование без КТ. б — гистограмма увеличения ИФ клеточной популяции по сравнению с контролем, принятым за 1. Приведены данные репрезентативного эксперимента.

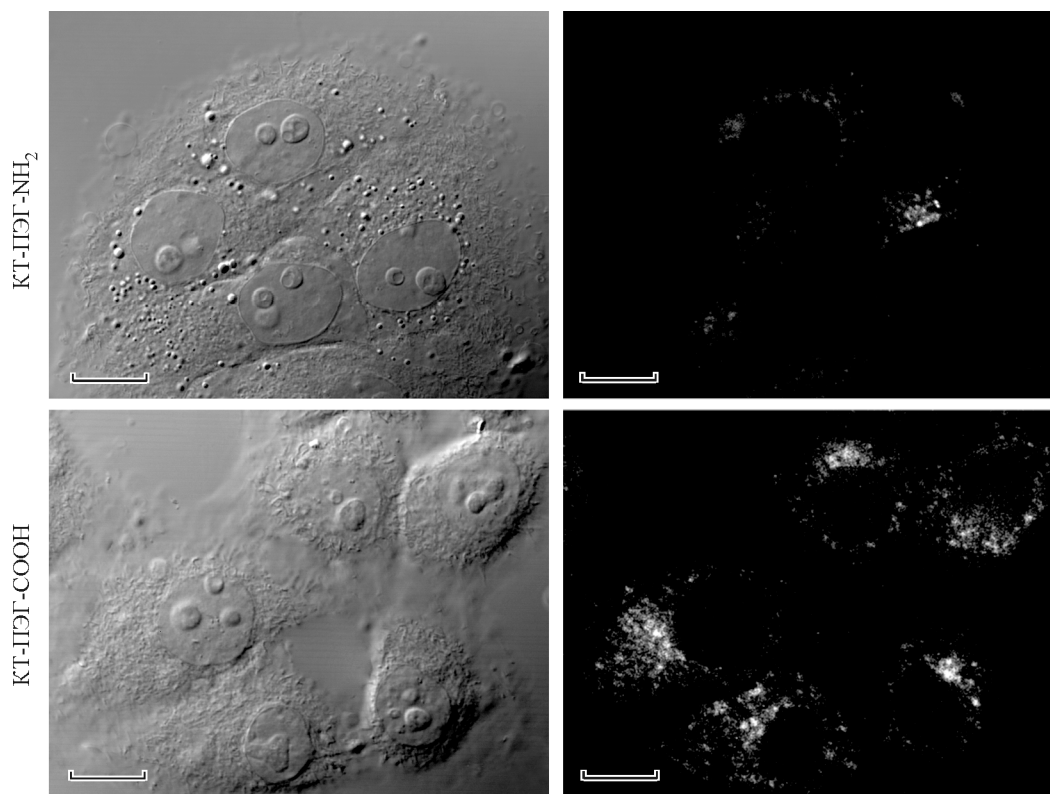


Рис. 5. Поглощение КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> или КТ-ПЭГ-COOH в концентрации 20 нМ клетками HeLa.

Клетки культивировали с КТ 24 ч. Представлены дифференциально-контрастные (левый ряд) и конфокальные (правый ряд) изображения клеток при возбуждении лазером 405 нм. Приведены репрезентативные изображения из 3 независимых экспериментов. Масштабные отрезки — 10 мкм.

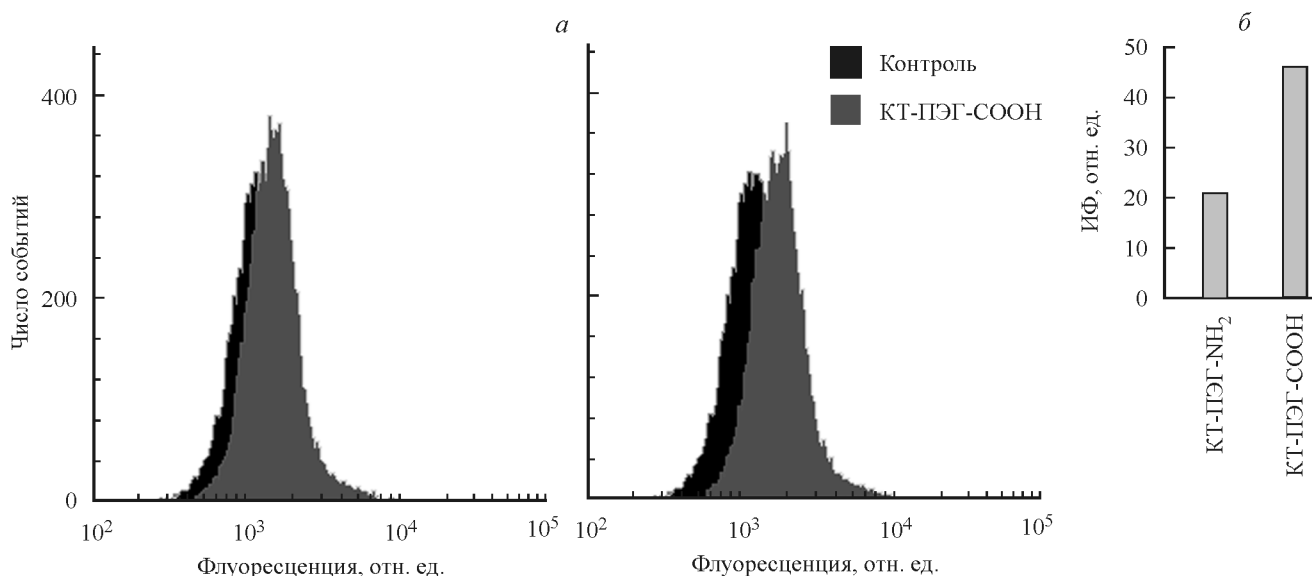


Рис. 6. Накопление КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-СООН в концентрации 30 нМ в клетках HeLa через 24 ч совместного культивирования. Проточная цитометрия.

a — гистограммы, показывающие изменение интенсивности флуоресценции (ИФ) клеточной популяции. Контроль — культивирование без КТ. б — гистограмма увеличения ИФ клеточной популяции по сравнению с контролем, принятым за 1. Приведены данные репрезентативного эксперимента.

увеличивается на 21 %, а для КТ-ПЭГ-СООН — на 46 % (рис. 6). Таким образом, складывается впечатление, что СООН-группы способствуют проникновению КТ в клетки вне зависимости от состава ядра КТ. Однако с учетом различий в степени тушения исследуемых нами КТ окончательный вывод может быть сделан лишь после определения значения рН во внутриклеточных структурах,

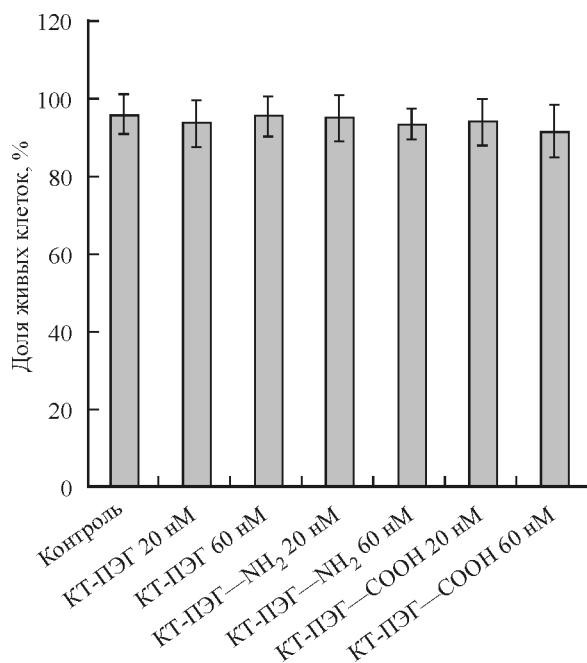


Рис. 7. Выживаемость клеток HeLa через 24 ч их культивирования с КТ-ПЭГ, КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub> и КТ-ПЭГ-СООН при концентрациях 20 и 60 нМ.

Проточная цитометрия с использованием PI. Представлены средние значения и их 95%-ный доверительный интервал.

содержащих частицы, через 24 ч после начала взаимодействия с КТ и степени агрегированности этих частиц.

Токсичность КТ всегда является важным вопросом для успешного применения КТ в биологических системах. Однако в большинстве работ по цитотоксичности КТ на основе кадмия, в которых токсический эффект оказывался значительным, исследовали либо влияние непосредственно ионов кадмия на клетки, либо влияние КТ с минимально защищенным от утечки металлов ядром, либо использовали слишком высокие концентрации КТ. Некоторые исследователи считают, что важную роль в развитии цитотоксичности играют именно поверхностные модификации КТ (Hoshino et al., 2004; Hardman, 2006; Ryman-Rasmussen et al., 2006; Lee et al., 2010). Поэтому мы непосредственно оценили цитотоксичность для клеток HeLa частиц на основе InP/ZnS (КТ-ПЭГ-NH<sub>2</sub>, КТ-ПЭГ-СООН) и CdSe/ZnS (КТ-ПЭГ) в концентрациях 20 и 60 нМ с помощью цитометрического анализа, используя PI, способного накапливаться в ядрах только мертвых клеток. Данные, приведенные на рис. 7, показывают, что через 24 ч после добавления к клеткам, независимо от состава ядра КТ и их концентрации, ядер клеток, окрашенных PI, оказалось менее 10 %. Таким образом, наблюдается высокая выживаемость клеток HeLa. Несмотря на то что в эксперименте использовали достаточно высокие концентрации наночастиц, необходимо учитывать, что все исследуемые КТ содержат оболочку из ПЭГ, которая существенно снижает их проникновение в клетки HeLa.

Таким образом, мы показали, что покрытые оболочкой из ПЭГ КТ на основе CdSe/ZnS и InP/ZnS с различными реактивными группами на поверхности, не различаясь по токсичности, накапливались в наших экспериментальных условиях в культивируемых клетках разного происхождения в зависимости от реактивных групп, локализованных на ПЭГ-оболочке. Так, максимально эффективно в клетку проникали КТ, покрытые ПЭГ с СООН-группа-



ми. Эти данные полностью согласуются с результатами, полученными на КТ на основе CdSe (Zhang et al., 2013) и CdTe/CdSe (Clift et al., 2008) с функциональными группами –COOH и –NH<sub>2</sub> на поверхности ПЭГ-оболочки. Авторы цитируемых работ также показали, что макрофаги J774.A1, клетки моноцитарной лейкемии THP-1 и клетки карциномы легкого A549 поглощают КТ-ПЭГ-СООН более эффективно. Однако строго говоря, продемонстрированное нами гашение флуоресценции КТ в кислой среде, степень которого зависит от природы реактивной группы, позволяет говорить лишь о «кажущемся» уровне поступления метки в клетки, особенно если это поступление оценивалось на основе одной временной точки. Для адекватного понимания вклада гашения в оценку внутриклеточного накопления КТ необходим анализ динамики поступления флуорофоров в клетку совокупно с исследованием динамики закисления везикулярных структур и уровня агрегированности КТ в эндосомах, начиная с ранних стадий эндоцитоза.

Следует подчеркнуть большую важность продемонстрированного феномена для адекватной интерпретации данных иммунофлуоресцентного анализа с участием КТ. Действительно, в последние годы методы обработки и анализа флуоресцентных изображений клеток получили очень широкое распространение, в частности для оценки количественных параметров динамики таких процессов, как эндоцитоз (Collinet et al., 2010; Tonti et al., 2015). При этом большинство авторов сравнивают скорости внутриклеточного накопления меченных разными флуорофорами белков или их исчезновение в результате деградации по изменению интегральной интенсивности флуоресценции целых клеток, не учитывая возможного гашения люминесценции при попадании меченных белков в эндосомы и далее в лизосомы. Такой подход дает корректные оценки лишь при использовании флуорофоров, нечувствительных к pH, а в случае КТ возможна неадекватная интерпретация результатов.

Наши результаты и данные других авторов позволяют говорить о том, что опасность использования пэгиллированных КТ с кадмиевым ядром на уровне их взаимодействия с клетками существенно преувеличивается. Однако это не исключает проявлений токсичности на уровне тканей и органов живого организма при длительном (более 24 ч) пребывании в них таких КТ. Таким образом, использование КТ, полученных на основе элементов, не обладающих токсичностью, остается актуальной задачей. Мы показали, что КТ на основе InP/ZnS ведут себя так же, как и КТ на основе CdSe/ZnS, и могут легко детектироваться внутри клеток. Для их широкого введения в экспериментальную практику необходимо решить задачи по увеличению квантового выхода люминесценции этих частиц и получению более узкого пика люминесценции, что может быть достигнуто оптимизацией условий синтеза и солубилизации КТ на основе InP.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068), ФАНО России.

#### Список литературы

Беляева Т. Н., Салова А. В., Леонтьева Е. А., Моженов Т. П., Корнилова Е. С., Кроленко С. А. 2009. Нецелевые квантовые точки в прижизненных конфокально-микроскопических исследованиях клеток. Цитология. 51 (10) : 830—837.

(Belyaeva T. N., Salova A. V., Leontieva E. A., Mozhenok T. P., Kornilova E. S., Krolenko S. A. 2009. Untargeted quantum dots in confocal microscopy of living cells. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 3 (6) : 551—558.)

Aldana J., Lavelle N., Wang Y. J., Peng X. G. 2005. Size-dependent dissociation pH of thiolate ligands from cadmium chalcogenide nanocrystals. J. Amer. Chem. Soc. 127 : 2496—2504.

Aldana J., Wang Y. A., Peng X. 2001. Photochemical instability of CdSe nanocrystals coated by hydrophilic thiols. J. Amer. Chem. Soc. 123 : 8844—8850.

Avellini T., Amelia M., Credi A., Silvi S. 2013. Effect of protons on CdSe and CdSe-ZnS nanocrystals in organic solution. Langmuir. 29 : 13 352—13 358.

Bentzen E. L., Tomlinson I. D., Mason J., Gresch P., Warnement 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., Makita Y., Sonoda A., Yokoyama H., Baba Y., Ishikawa M. 2005. Temperature-sensitive photoluminescence of CdSe quantum dot clusters. J. Phys. Chem. B. 109 : 13 899—13 905.

Boldt K., Bruns O. T., Gaponik N., Eychmüller A. 2006. Comparative examination of the stability of semiconductor quantum dots in various biochemical buffers. J. Phys. Chem. B. 110 : 1959—1963.

Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A. P. 1998. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. Science. 281 : 2013—2016.

Cho S. J., Maysinger D., Jain M., Roder B., Hackbarth S., Winnik F. M. 2007. Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells. Langmuir. 23 : 1974—1980.

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.

Collinet C., Stoter M., Bradshaw C. R., Samusik N., Rink J. C., Kenski D., Habermann B., Buchholz F., Henschel R., Mueller M. S., Nagel W. E., Fava E., Kalaidzidis Y., Zerial M. 2010. Systems survey of endocytosis by multiparametric image analysis. Nature. 464 : 243—249.

Dabbousi B. O., Rodriguez-Viejo J., Mikulec F. V., Heine J. R., Mattoussi H., Ober R., Jensen K. F., Bawendi M. G. 1997. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. J. Phys. Chem. B. 101 : 9463—9475.

Derfus A. M., Chan W. C. W., Bhatia S. N. 2004. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. Nano Lett. 4 : 11—18.

Durisc N., Godin A. G., Walters D., Grutter P., Wiseman P. W., Heyes C. D. 2011. Probing the «dark» fraction of core-shell quantum dots by ensemble and single particle pH-dependent spectroscopy. ACS Nano. 5 : 9062—9073.

Esteve-Turrillas F. A., Abad-Fuentes A. 2013. Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes. Biosens. Bioelectron. 41 : 12—29.

Gao X., Chan W., Nie S. 2002. Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding. J. Biomed. Opt. 7 : 532—537.

Hardman R. 2006. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. Environ. Health Perspect. 114 : 165—172.

Hines D. A., Kamat P. V. 2014. Recent advances in quantum dot surface chemistry. ACS Appl. Mat. Interfaces. 6 : 3041—3057.

Hoshino A., Fujioka K., Oku T., Suga M., Sasaki Y. F., Ohta T., Yasuhara M., Suzuki K., Yamamoto K. 2004. Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification. Nano Lett. 4 : 2163—2169.

Kim S., Fisher B., Eisler H. J., Bawendi M. 2003. Type-II quantum dots: CdTe/CdSe(core/shell) and CdSe/ZnTe(core/shell) heterostructures. Amer. Chem. Soc. 125 : 11 466—11 467.

- Kirchner C., Liedl T., Kudera S., Pellegrino T., Muñoz Javier A., Gaub H. E., Stölzle S., Fertig N., Parak W. J. 2005. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Lett.* 5 : 331—338.
- Lee J., Ji K., Kim J., Park C., Lim K. H., Yoon T. H., Choi K. 2010. Acute toxicity of two CdSe/ZnSe quantum dots with different surface coating in *Daphnia magna* under various light conditions. *Environ. Toxicol.* 25 : 593—600.
- Liu B. R., Winiarz J. G., Moon J.-S., Lo S.-Y., Huang Y.-W., Aronstam R. S., Lee H.-J. 2013. Synthesis, characterization and applications of carboxylated and polyethylene-glycolated bifunctionalized InP/ZnS quantum dots in cellular internalization mediated by cell-penetrating peptides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 111 : 162—170.
- Liu Y. S., Sun Y., Vernier P. T., Liang C. H., Chong S. Y., Gunderson M. A. 2007. pH-sensitive photoluminescence of CdSe/ZnSe/ZnS quantum dots in human ovarian cancer cells. *J. Phys. Chem. C: Nanomater. Interfaces.* 111 : 2872—2878.
- Mo D., Hu L., Zeng G., Chen G., Wan J., Yu Z., Huang Z., He K., Zhang C., Cheng M. 2017. Cadmium-containing quantum dots: properties, applications, and toxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 : 2713—2733.
- Muller J., Lupton J. M., Lagoudakis P. G., Schindler F., Koeppe R., Rogach A. L., Feldmann J., Talapin D. V., Weller H. 2005. Wave function engineering in elongated semiconductor nanocrystals with heterogeneous carrier confinement. *Nano Lett.* 5 : 2044—2049.
- Rosenthal S. J., Chang J. C., Kovtun O., McBride J. R., Tomlinson I. D. 2011. Biocompatible quantum dots for biological applications. *Chem. Biol.* 18 : 10—24.
- Ryman-Rasmussen J. P., Riviere J. E., MonteiroRiviere N. A. 2006. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 127 : 143—153.
- Smith A. M., Duan H., Mohs A. M., Nie S. 2008. Bioconjugated quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 60 : 1226—1240.
- Soenen S. J., Manshian B. B., Aubert T., Himmelreich U., De-meester J., De Smedt S. C., Hens Z., Braeckmans K. 2014. Toxicity of cadmium-free quantum dots and their use in cell bioimaging. *Chem. Res. Toxicol.* 27 : 1050—1059.
- Tomasulo M., Yildiz I., Raymo F. M. 2006. pH-sensitive quantum dots. *J. Phys. Chem. B.* 110 : 3853—3855.
- Tonti S., Di Cataldo S., Bottino A., Ficarra E. 2015. An automated approach to the segmentation of hep-2 cells for the indirect immunofluorescence ANA test. *Comput. Med. Imaging Graph.* 40 : 62—69.
- Uyeda H. T., Medintz I. L., Jaiswal J. K., Simon S. M., Mattoussi H. 2005. Synthesis of compact multidentate ligands to prepare stable hydrophilic quantum dot fluorophores. *Amer. Chem. Soc.* 127 : 3870—3878.
- Walker G. W., Sundar V. C., Rudzinski C. M., Wun A. W., Bawendi M. G., Nocera D. G. 2003. Quantum-dot optical temperature probes. *Appl. Phys. Lett.* 83 : 3555—3557.
- Wuister S. F., van Houselt A., Donega C. D. M., Vanmaekelbergh D., Meijerink A. 2004. Temperature anti-quenching of the luminescence from capped CdSe quantum dots. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 : 3029—3033.
- Yang S., Zhao P., Zhao X., Qua L., Lai X. 2015. InP and Sn:InP based quantum dot sensitized solar cells. *J. Mater. Chem. A.* 3 : 21 922—21 929.
- Young K. T., Wang Y., Roy I., Rui H., Swihart M. T., Law W. C., Kwak S. K., Ye L., Liu J., Mahajan S. D., Reynolds J. L. 2012. Preparation of quantum dot/drug nanoparticles formulations for traceable targeted delivery and therapy. *Theranostics.* 2 : 681—694.
- Yu W. W., Qu L., Guo W., Peng X. 2003. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe, and CdS nanocrystals. *Chem. Mater.* 15 : 2854—2860.
- Zhang Y., Pan H., Zhang P., Gao N., Lin Y., Luo Z., Li P., Wang C., Liu L., Pang D., Cai L., Ma Y. 2013. Functionalized quantum dots induce proinflammatory responses *in vitro*: the role of terminal functional group-associated endocytic pathways. *Nanoscale.* 5 : 5919—5929.
- Zhong W., Zhang C., Gao Q., Li H. 2012. Highly sensitive detection of lead(II) ion using multicolor CdTe quantum dots. *Microchim. Acta.* 176 : 101—107.

Поступила 11 VII 2017

QUANTUM DOTS BASED ON INDIUM PHOSPHIDE (InP):  
THE EFFECT OF CHEMICAL MODIFICATIONS OF THE ORGANIC SHELL ON INTERACTION  
WITH CULTURED CELLS OF VARIOUS ORIGINS

I. K. Litvinov,<sup>1,2</sup> T. N. Belyaeva,<sup>1</sup> A. V. Salova,<sup>1</sup> N. D. Aksenov,<sup>1</sup> E. A. Leontieva,<sup>1</sup>  
A. O. Orlova,<sup>2</sup> E. S. Kornilova<sup>1-4,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

<sup>2</sup> ITMO University, St. Petersburg, 199034,

<sup>3</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251,

and <sup>4</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034;

\* e-mail: elena.kornilova@gmail.com; avsalova@gmail.com

CdSe and CdTe-based semiconductor fluorescent nanocrystals, also called quantum dots (QDs), attract the attention of biologists due to their wide range of emission in a visible light interval, high fluorescence quantum yield and photostability. However, their application is limited because of possible toxicity of cadmium. Indeed, there is a probability of metal leakage from QDs cores as a result of damage to both inorganic and organic layers of shells covering QDs. An alternative to cadmium QDs could be nanostructures having as a core, for example, of non-toxic indium phosphide InP, also emitting in the visible region of the spectrum. At present, there is few works on the use of these particles in biology. In this study, a comparative analysis of the spectral-luminescent properties of two InP/ZnS-QDs samples coated with PEG carrying-COOH or -NH<sub>2</sub> functional groups was performed, and the obtained data were compared with the characteristics of CdSe/ZnS-QDs coated with PEG. The photophysical properties of all QDs in aqueous solution corresponded to the information claimed by manufacturers, but the fluorescence quantum yield of InP-based nanoparticles was found to be lower than that of CdSe-QDs. We also show that the photoluminescence of all types of QDs at pH 4.0 was lower than at pH 7.4, while the decrease in fluorescence intensity was minimal in the case of QDs-PEG-COOH. Studying the uptake of all three types of QDs by J774 macrophages, we found that the fluorescence spectra of internalized QDs do

not change in comparison with those in solution. All three types of QDs after 24 hours of incubation were accumulated in the cells, but while QDs-NH<sub>2</sub> and QDs without reactive groups were detected mainly in vesicular-like discrete structures, the QDs-COOH were diffusely distributed throughout the cytoplasm, which indicates different mechanisms of interaction with cell membranes. In nonphagocytic HeLa cells, all types of QDs behaved similarly, but the overall level of cells fluorescence was much lower. This may be due to both reduced non-specific uptake and possible quenching of QDs fluorescence in acidic endolysosomes. Cytofluorimetric analysis of propidium iodide accumulation showed that after 24 hours incubation with all studied types of QDs as well as in control (no QDs), the proportion of lost HeLa cells did not exceed 10 %. Thus, it has been demonstrated that non-toxic InP-based QDs can be used as an effective tool for biological research.

**Key words:** CdSe and InP quantum dots, photoluminescence, macrophages J774, HeLa cells, pH.

---