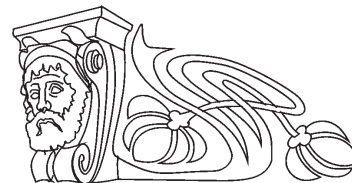




УДК 576.3

ПЛАЗМОННО-РЕЗОНАНСНЫЕ ЗОЛОТЫЕ ЧАСТИЦЫ КАК НОСИТЕЛИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ И ОПТИЧЕСКИЕ МЕТКИ В ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ



О. А. Бибикина*, С. А. Староверов**, О. И. Соколов,
Л. А. Дыкман, В. А. Богатырев

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов
E-mail: bog@ibppm.sgu.ru

*Саратовский государственный университет

E-mail: olyagasina@mail.ru

**Саратовская научно-исследовательская ветеринарная станция РАСХН

E-mail: staroverov@ibppm.sgu.ru

В работе проведено исследование влияния золотых плазмонно-резонансных частиц (зПРЧ) и комплекса зПРЧ с противораковым препаратом проспидином на некоторые физиологические функции (эндоцитоз, дыхательную активность, жизнеспособность) опухолевых клеток линий HeLa и SPEV-2. Для визуализации клеток и ПРЧ использовали комбинирование нескольких микроскопических режимов регистрации светорассеяния и флуоресценции. В качестве плазмонно-резонансных меток было использовано цитратное коллоидное золото диаметром ~50 нм. Использование зПРЧ с последующей окраской катионным флуоресцентным красителем акридиновым оранжевым позволило надежно визуализировать метки методами световой микроскопии и определить их локализацию внутри клеток с помощью конфокальной микроскопии. Показано усиление цитостатического действия проспидина в комплексе с коллоидным золотом.

Ключевые слова: плазмонно-резонансные частицы, флуоресцентные красители, конфокальная микроскопия, дифференциально-интерференционный контраст, темнопольная микроскопия, жизнеспособность клетки, эндоцитоз.

Plasmon-Resonance Gold Nanoparticles as Drug Carriers and Optical Labels for Cytological Investigations

O. A. Bibikova, S. A. Staroverov, O. I. Sokolov,
L. A. Dikman, V. A. Bogatyrev

In this paper we report on the investigation of the influence of plasmon resonant gold nanoparticles (PRGNPs) and their complex with anti-cancer drug prospidin to the physiological functions (endocytosis, respiratory activity, viability) of tumor cell lines HeLa and SPEV-2. We used the combination of several microscopic regimes to register the light scattering and fluorescence for visualization the cells and PRGNPs. The citrate-stabilized colloidal gold with average particle diameter 50 nm was used as plasmon resonant labels. The use of PRGNPs with subsequent staining by cationic fluorescent dye acridine orange enabled to visualize the labels by light microscopy and estimate their localization inside the cells by the confocal microscopy. We showed the enhancement of cytostatic activity of prospidin in the complex with the colloidal gold.

Key words: plasmon-resonance gold nanoparticles, fluorescent labels, confocal microscopy, differential interference contrast microscopy, dark-field microscopy, viability, endocytosis.

Введение

Применение плазмонно-резонансных наночастиц (ПРЧ) является принципиально новым и перспективным методом диагностики и терапии онкозаболеваний, позволяющим выявить патологию на ранних стадиях и сделать лечение более щадящим за счет снижения токсического эффекта препаратов. Для проведения успешной диагностики и терапии онкологических заболеваний необходимо определить, проникает ли коллоидное золото в клетку или локализуется на ее поверхности. Не менее важно изучение жизнеспособности клеток, конъюгированных с золотом, как для фундаментальных исследований цитотоксичности ПРЧ, так и для определения эффективности противоопухолевой терапии.

В настоящее время предложено достаточное количество способов определения локализации золотых наночастиц методами электронной микроскопии [1, 2], дифференциально-интерференционно контрастной (ДИК) микроскопии [3, 4] и конфокальной микроскопии. В режиме конфокальной микроскопии визуализация внутриклеточных процессов с использованием плазмонно-резонансных частиц в основном проводится в режиме мультифотонной флуоресценции [5–7]. Стандартная конфокальная микроскопия требует флуоресцентных зондов, в то время как золотые частицы обладают лишь очень слабой флуоресценцией. В работах Ч. Миркина с соавторами [8] конструкции, состоящие из коллоидного золота в комбинации с флуоресцентными зондами, называют нанофакелами (nanoflares). Физический смысл нанофакелов заключается в обратимом тушении флуоресценции вблизи или на поверхности плазмонно-резонансных частиц.



Аналогичные конструкции использованы в работах Х. Ли, Л. Розберга [9] для анализа ДНК-последовательностей в клинической диагностике, в том числе в ПЦР-продуктах.

Целью данной работы была разработка методов использования золотых плазмонно-резонансных частиц (зПРЧ) для доставки проспирина в клетки и визуализации этого процесса методами традиционной и конфокальной световой микроскопии.

Материалы и методы

Используемые приборы. Световой микроскоп Leica DM 2500 с дополнительным галогеновым осветителем Leica CLS 150, позволяющим освещать объект с двух сторон сбоку, для реализации режима темного поля. Захват и анализ изображений проводили с помощью цифровой видеокамеры Leica DFC 420 C и программного обеспечения Leica Application Suite V 3.1.

Конфокальный микроскоп Leica LSM SP-5 (Leica Microsystems, Германия) в режиме регистрации светорассеяния (при совмещении полосы возбуждения и приема в красной области спектра) и флуоресценции (со спектральным сдвигом соответствующим используемым флуорофорам).

Планшетный ридер Multiscan Ascent Thermo (Scientific), оптическую плотность измеряли на длине волны 492 нм.

Используемые материалы. В качестве плазмонно-резонансных меток использовали цитратное коллоидное золото, полученное по методу Г. Френса [10], диаметр частиц 50 нм. В качестве лекарственного препарата использовали противоопухолевый цитостатический препарат проспирин. В комбинации с проспиринем золотые наночастицы были дополнительно покрыты тиолированным полиэтиленгликолем и меркаптоундекановой кислотой. Были использованы культуры клеток почек эмбрионов свиньи (SPEV-2) и человеческих раковых клеток HeLa, полученные из криобанка коллекции клеточных культур лаборатории вирусологии (Саратов) научно-исследовательской ветеринарной станции РАСХН. Культивирование клеточных культур проводили в пластиковых флаконах в полной RPMI среде (10%-ная эмбриональная сыворотка, гентамицин, ампициллин, амфотерицин).

Используемые реактивы. 0.1-ный % раствор Acridine Orange Stain (акридиновый оранжевый краситель); 0.1%-ный раствор Propidium iodide (краситель йодистый пропидий); 0.1%-ный раствор Eozin B (краситель эозин); 0.1%-ный раствор Fluorescein-Na (Uranin) (краситель уранин);

3%-ный раствор glutaric dialdehyde (глутаровый альдегид); 10 mM солевой фосфатный буфер (PBS); 5%-ный раствор тетра нитросинего тетразолия бромид (МТТ) в растворе Хенкса; 10%-ный раствор диметилсульфоксида (ДМСО).

Культивирование клеток с золотыми наночастицами. Клетки линии HeLa инкубировали золотыми наночастицами ($2.7 \cdot 10^9$ мл⁻¹) в течение 72 ч, после этого ресуспендировали в чистой питательной среде. Подсчет клеток осуществлялся в камере Горяева. Определение дыхательной активности проводилось колориметрическим тестом (МТТ-тест) по методике, описанной М. Никс и М. Отто [11] с небольшими модификациями. Показания оптической плотности считывали на планшетном ридере Multiscan Ascent Thermo (Scientific).

Определение жизнеспособности клеток. Концентрацию клеток доводили до 10^6 мл⁻¹. Клетки окрашивали: а) раствором уранина (конечная концентрация красителя 2 пг/мл) и йодистого пропидия (конечная концентрация 0.6 пг/мл), инкубировали 10 мин, ресуспендировали в воде (mQ), изготавливали препараты; б) раствором берберина (конечная концентрация 1 мкг/мл) и эозина (0.1 мкг/мл), инкубировали 15 мин, ресуспендировали в воде (mQ), изготавливали препараты. В обоих случаях мертвыми считали ярко-красные клетки, остальные – живыми.

Изучение возможностей использования золотых сферических наночастиц для доставки проспирина. Концентрацию клеток доводили до 10^6 мл⁻¹. Проводили проверку цитостатической активности чистого проспирина и комплекса проспирин – коллоидное золото на клетках SPEV-2 с помощью МТТ-теста. Проводили титрование раствора золота в среде, содержащей проспирин (концентрация проспирина 12.5 мг/мл) методом двойных разведений с изменением концентрации от 10000 частиц на одну клетку до 100 частицы на одну клетку. Проводили титрование раствора проспирина в среде, содержащей золотые частицы (концентрация частиц примерно 100000 на 1 клетку) с изменением концентрации проспирина от 12.5 до 1.5 мг/мл. Клеточную суспензию инкубировали с полученными растворами в течение 72 ч при 37° С. В качестве контроля использовали чистую питательную среду и среду с коллоидным золотом (100000 частиц на 1 клетку). Проверка цитостатической активности комплекса проспирин – коллоидное золото с использованием клеток HeLa проводилась для концентраций проспирина, равных 2, 3 и 4 мг/мл.



Результаты и их обсуждение

Усиление светимости золотых наночастиц в результате их взаимодействия с катионными флуоресцентными красителями происходит благодаря увеличению сечения рассеяния ПРЧ за счет адсорбции флуорофора на поверхности частиц, что, в свою очередь, может приводить к агрегации частиц. Комбинирование золотых наночастиц с флуоресцентными метками позволяет визуализировать ПРЧ внутри клеток с помощью конфокального микроскопа путем создания оптических срезов в режиме регистрации светорассеяния и флуоресценции.

На рис. 1 представлен срединный оптический срез клетки. Наличие золотых частиц на срезе доказывает их локализацию внутри клетки.

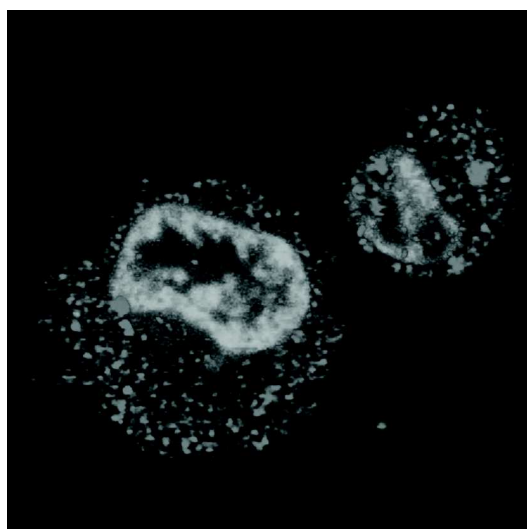


Рис. 1. Срединный оптический срез клеток SPEV-2, меченных «комплексом краситель акридин-оранжевый – золотые наночастицы»

Основываясь на сходстве химического строения акридина оранжевого и проспирина, авторами статьи было проведено исследование влияния комплекса проспирин–коллоидное золото на дыхательную активность опухолевых клеток с помощью МТТ-теста. При исследовании взаимодействия лекарственного комплекса с клетками было обнаружено, что чистый проспирин в малых концентрациях не обладает выраженным цитостатическим эффектом (угнетение дыхательной активности на 10%), но при присоединении к золотым наночастицам вызывает угнетение дыхания не менее чем на 60%. Изменение цитостатических свойств препарата мы объясняем проникновением комплекса внутрь клетки путем эндоцитоза за счет транспортной функции золотых наночастиц (рис. 2).

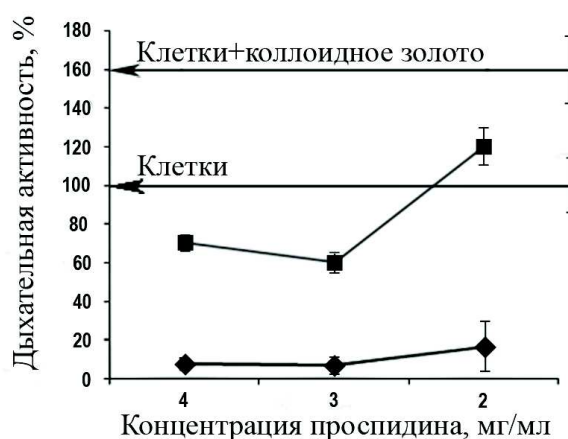


Рис 2. Зависимость дыхательной активности клеток HeLa, инкубированных с проспирин и ПРЧ, в зависимости от количества проспирина: ♦ – проспирин + коллоидное золото; ■ – клетки + коллоидное золото

Следует отметить, что коллоидное золото не оказывает существенного влияния на цитостатическую активность концентрированного проспирина.

При проведении серии экспериментов было обнаружено, что золотые сферические наночастицы увеличивают дыхательную активность клеток предположительно за счет влияния на клеточный метаболизм. В дальнейшем необходимо провести более глубокое исследование влияния чистого коллоидного золота на жизнеспособность клеток, а также механизма проникновения частиц через мембрану.

При комбинировании режимов темного поля и флуоресценции смешанные метки позволяют исследовать влияние золотых наночастиц на жизнеспособность и морфологию клеток. Мертвые клетки, окрашенные витальным красителем, имеют ярко красную окраску (рис. 3). Для четкой дифференциации живых и мертвых клеток следует использовать пары красителей, интенсивность свечения которых примерно одинакова. В данной работе были использованы витальные красители берберин и эозин, а также уранин и йодистый пропидий. При этом исследовать жизнеспособность клеток, окрашенных эозином, можно также в режиме светлого поля.

Структура клеток и локализация ПРЧ могут быть выявлены в режиме дифференциально-интерференционного контраста путем настройки призм для получения максимального темного поля с применением дополнительного бокового освещения.

На рис. 4 золотые частицы четко просматриваются в виде множества ярких точек.

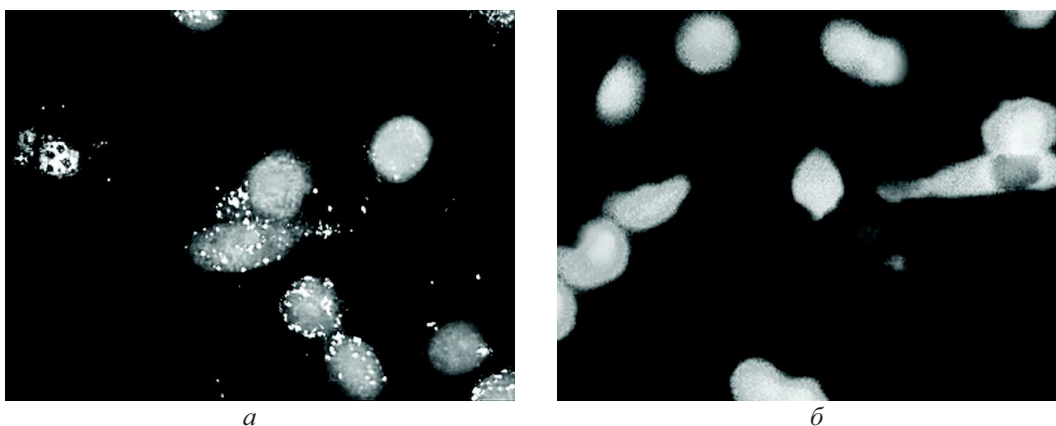


Рис. 3. Клетки HeLa, окрашенные берберинем и йодистым пропидием, *а* – конъюгированные с золотыми наночастицами, *б* – контроль

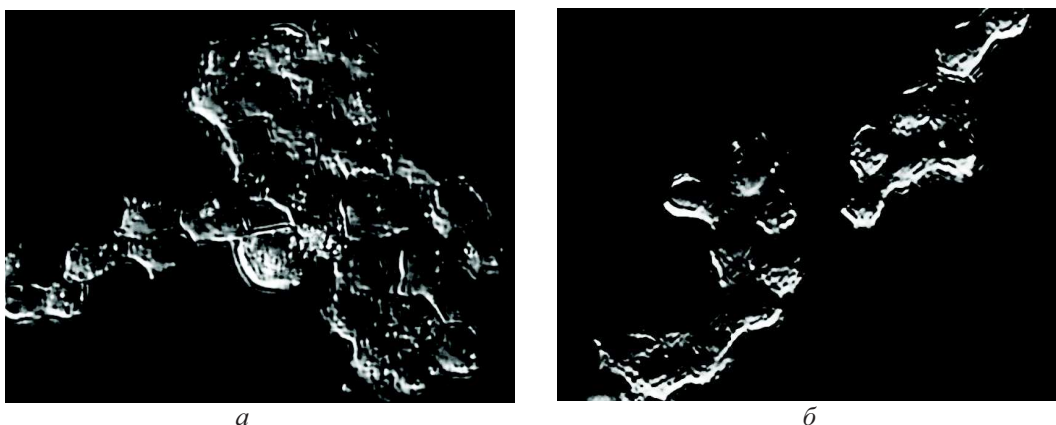


Рис. 4. Изображения клеток HeLa в режиме дифференциально-интерференционного контраста с боковым освещением, *а* – инкубированных с золотом, *б* – контроль

Таким образом, предлагаемый нами подход к использованию ПРЧ в комбинации с лекарственными веществами и флюоресцентными красителями для цитологических исследований позволяет определять колокализацию ПРЧ с клеточными структурами и их влияние на морфофизиологические параметры клеток, изучать биораспределение ПРЧ на микропопуляционном уровне.

Список литературы

1. *Nativo P., Prio I., Brust A. M.* Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles // *Acs Nano*. 2008. Vol. 2, № 8. P. 1639–1644.
2. *Fuente J. M., Berry C. C.* Tat peptide as an efficient molecule to translocate gold nanoparticles into the cell nucleus // *Bioconjugate Chem*. 2005. Vol. 165, № 5. P. 1176–1180.
3. *Wang G., Stender A. S., Sun W., Fang N.* Optical imaging of non-fluorescent nanoparticle probes in live cells // *Analyst*. 2010. Vol. 135, № 2. P. 215–221.
4. *Sun W., Wang G., Fang N., Yeung E. S.* Wavelength-dependent differential interference contrast microscopy: selectively imaging nanoparticle probes in live cells // *Anal. Chem*. 2009. Vol. 81. P. 9203–9208.
5. *Diagaradjane P., Shetty A., Wang J. C., Elliott A. M., Schwartz J., Shentu S., Park H. C., Deorukhkar A., Stafford R. J., Cho S. H., Tummell J. W., Hazle J. D., Krishnan S.* Modulation of in vivo tumor radiation response via gold nanoshell-mediated vascular-focused hyperthermia : characterizing an integrated anti-hypoxic and localized vascular disrupting targeting strategy // *Nano Lett*. 2008. Vol. 8, № 3. P. 1492–1500.
6. *Durr N. J., Larson T., Smith D. K., Korgel B. A., Sokolov K., Ben-Yakar A.* Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods // *Nano Lett*. 2007. Vol. 7, № 4. P. 941–945.
7. *Huff T. B., Hansen M. N., Zhao Y., Cheng J. Wei A.* Controlling the cellular uptake of gold nanorods // *Langmuir*. 2007. Vol. 23, № 4. P. 1596–1599.
8. *Seferos D. S., Giljohann D. A., Hill H. D., Prigodich A. E., Mirkin C. A.* Nano-Flares : Probes for transfection and mRNA detection in living cells // *J. Amer. Chem. Soc*. 2007. Vol. 129. P. 15477–15479.
9. *Li H., Rothberg L.* Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by polymerase chain reaction // *JACS*. 2004. Vol. 126. P. 10958–10961.
10. *Frens G.* Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature Phys. Sci*. 1973. Vol. 241. P. 20–22.
11. *Niks M., Otto M.* Towards an optimized MTT assay // *J. Immunol*. 1900. Vol. 130, № 1. P. 149–151.