

**КОМПЛЕКСЫ НАНОРАЗМЕРНЫХ АЛМАЗОВ С КУМАРИНОМ:
СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА
И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С МАКРОФАГАМИ**

© 2019 г. Н. Г. Бердникова^{1,2}, А. Е. Донцов¹, М. В. Ерохина³, П. П. Зак¹, В. А. Лапина⁴,
А. Г. Масютин³, В. А. Меньшов¹, В. В. Наумов¹, Г. Е. Онищенко³, Т. А. Павич⁴,
П. П. Першукевич⁴, Н. Л. Сакина¹, А. В. Трофимов^{1,5*}, Н. Н. Трофимова¹,
Ю. Б. Цаплев¹, О. И. Яблонская¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴Институт физики им. Б.И. Степанова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

⁵Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московской обл., Россия

*E-mail: avt_2003@mail.ru

Поступила в редакцию 05.06.2019;
после доработки 05.06.2019;
принята в печать 20.06.2019

Представлены модельные исследования комплексов Кумарина 343 с наноразмерными алмазами детонационного синтеза. Образование комплексов молекул кумарина с алмазными наночастицами за счет ковалентных связей приводит к заметному изменению их спектрально-люминесцентных свойств, позволяющему различать поведение свободного красителя и связанного люминофора в изучаемых объектах, в том числе в клеточных культурах. Эксперименты с культурой острой моноцитарной лейкемии человека показали, что изученные алмазные наноконструкции легко захватываются клетками и визуализируются в них, и, таким образом, подобные комплексы можно применять для переноса фотоуправляемых реагентов, а в перспективе – новых лекарств.

Ключевые слова: наноразмерные алмазы, Кумарин 343, спектрально-люминесцентные свойства, клеточные культуры.

DOI: 10.1134/S0207401X19120045

ВВЕДЕНИЕ

Развитие нанотехнологий дало новый импульс к созданию высокотехнологичных материалов с уникальными свойствами и поиску сфер их эффективного применения. Одна из таких сфер – биомедицинская оптика со стоящими перед ней задачами диагностики и лечения целого ряда социально значимых заболеваний. Среди материалов, разрабатываемых для этой области, следует выделить материалы с оптически управляемыми свойствами на основе углеродных наночастиц, в том числе наночастиц алмазов, прежде всего детонационного синтеза [1, 2]. Свойства наноразмерных алмазов детонационного происхождения представляют значительный интерес во многих аспектах [3] из-за их разнообразных применений. Алмазные наночастицы малотоксичны, имеют относительно большую поверхность и сравнительно легко функционализируются, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных материалов для биомеди-

цинских приложений. В настоящей работе представлены модельные исследования наноконструкций алмазов с Кумарином 343, применяемым в качестве люминесцирующего красителя. Современные области исследования, в которых используется данный люминофор, отличаются большим разнообразием – от создания биоаналитических и биосенсорных методов и технологий [4] до разработки новых люминесцентных спектральных преобразователей для современных источников света [5, 6]. Кумарин 343 оказался удобен для настоящего исследования не в последнюю очередь благодаря наличию в нем карбоксильной группы, способствующей конъюгированию с алмазными наночастицами, обладающими аминогруппами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление образцов. Синтез алмазных наноконструкций Кумарина 343 осуществлялся по

отработанным ранее методикам [7–10] с использованием ультрадисперсных синтетических алмазов марки “УДА-СП” НП ЗАО “Синта” (Минск, Беларусь).

Спектральные измерения. Спектры люминесценции измеряли на спектрофлуориметре Lambda 55, электронные спектры поглощения – с помощью спектрофотометра Lambda 25 (оба спектрометра производства фирмы “PerkinElmer Inc.”, США). Регистрацию спектров ЭПР экспериментальных образцов проводили на ЭПР-спектрометре Bruker EMX (Германия).

Работа с клетками. В работе использовались клетки острой моноцитарной лейкемии человека линии ТНР-1 (Российская коллекция клеточных культур). Для культивирования ТНР-1 использовали среду RPMI-1640 с добавлением 2 мМ L-глутамин, 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Флаконы с клеточной суспензией инкубировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO₂. При высокой численности клетки склонны образовывать агрегаты, которые легко распадаются при встряхивании флакона. Активно пролиферирующие клетки нуждаются в частичной смене среды каждые 2–3 дня.

Макрофагальную дифференцировку клеток культуры ТНР-1 индуцировали путем добавления форболового эфира (Sigma-Aldrich, США). Принцип действия последнего до конца не известен, но предполагается, что он имитирует сигнальные молекулы, которые взаимодействуют с внутренним слоем плазматической мембраны и запускают каскад протеинкиназы С. В процессе необратимой дифференцировки клетки из суспензии оседают на субстрат, прикрепляются к нему и приобретают веретеновидную форму. В данной работе использовался форболовый эфир с концентрацией 10⁻⁴ М в исходном растворе и 10⁻⁷ М – в экспериментальных образцах.

Электронная и световая микроскопия. Для получения клеточного лизата, содержащего алмазные наноконплексы, клетки рассаживали в культуральные флаконы в количестве 5 · 10⁵ клеток на 1 мл (2.5 · 10⁶ клеток на флакон) в присутствии форболового эфира с концентрацией 10⁻⁷ М. На 3-й день дифференцировки во флаконы добавляли суспензию алмазных наночастиц для получения концентрации в 250 мкг/мл. Спустя 10 сут культивирования ростовую среду, содержащую непоглощенные наночастицы, отбирали, клетки открепляли от субстрата, добавляя раствор трипсина на буфере Версена в соотношении (1 : 3) по 1 мл на флакон. Полученную суспензию клеток центрифугировали при 2750 об/мин в течение 30 мин для осаждения клеток. После удаления супернатанта преципитат переносили в микропробирку, к осадку прибавляли 500 мкл дистиллированной воды и встряхивали на вортексе в течение

5 мин для разрушения клеток осмотическим шоком. Клеточный лизат затем центрифугировали при 10⁴ об/мин и удаляли супернатант. Далее нагревали в термостате до 85°C в течение получаса для разрушения остатков клеточных компонентов и несколько раз отмывали дистиллятом с последующим центрифугированием и отбором супернатанта.

Суспензию наночастиц объемом 10 мкл помещали на медную сетку, покрытую формваровой пленкой и высушивали при комнатной температуре в течение суток. Полученные препараты исследовали (в том числе методом дифракции электронов) с помощью аналитического электронного микроскопа JEM 2100 (Jeol, Япония).

Исследование ультраструктуры клеток ТНР-1, содержащих поглощенные алмазные наноконплексы, проводили по стандартной методике. Клетки рассаживали в чашки Петри со стеклами в количестве 5 · 10⁵ клеток на 1 мл (10⁶ клеток на чашку) в присутствии форболового эфира в концентрации 10⁻⁷ М. На 3-й день дифференцировки во флаконы добавляли суспензию алмазных наночастиц для получения концентрации 250 мкг на 1 мл. Спустя десять суток культивирования ростовую среду, содержащую непоглощенные наночастицы, отбирали, промывали клетки 0.1 М фосфатным буфером (рН 7.2–7.4) и фиксировали глутаровым 2.5%-ным альдегидом (Ted Pella, INC) на 0.1 М фосфатном буфере в течение 2 ч. Далее отмывали от фиксатора и дофиксировали 1%-ным раствором тетраоксида осмия (OsO₄) в течение 2 ч при 4°C. Обезвоживание образцов проводили в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, после чего заключали в эпоксидную смолу. Срезы с полученных блоков получали на ультрамикротоме (Leica, Германия) и окрашивали по Рейнольдсу. Полученные препараты исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа (ТЭМ) JEM 2100. Для получения ТЭМ-изображений использовали программное обеспечение Gatan. Изображения клеточной культуры были получены путем световой микроскопии с помощью DIC-микроскопа компании Leica (объектив с увеличением 40×, апертура – 0.5 NI plan).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральные свойства комплексов Кумарина 343 с наноразмерными алмазами

На рис. 1 приведены спектры поглощения образцов Кумарина 343 и его комплексов с наноразмерными алмазами, а также спектры возбуждения флуоресценции тех же образцов. Спектры флуоресценции Кумарина 343 и его алмазных наноконплексов показаны на рис. 2.

Из приведенных на рис. 1а спектров поглощения видно, что произошли существенные изменения в системе при комплексообразовании: наблю-

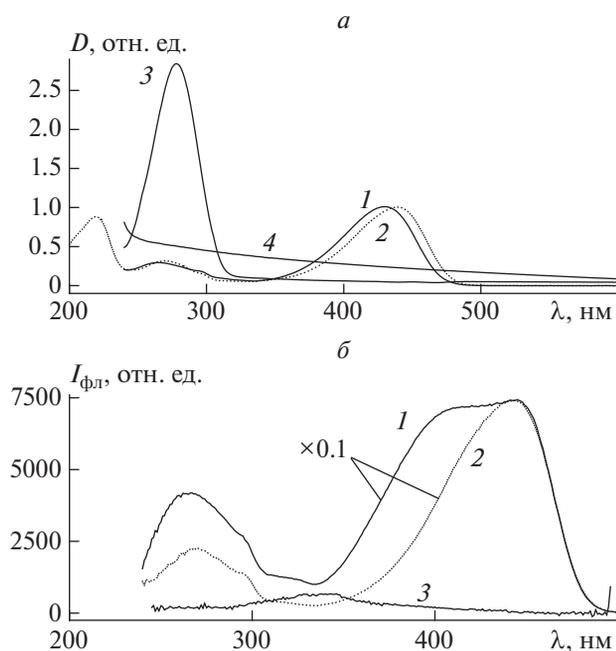


Рис. 1. *a* – Спектры поглощения: 1 и 2 – Кумарин 343 в фосфатном буфере (рН 7.4) в присутствии 5% ДМСО и в этаноле соответственно; 3 – конъюгат Кумарина 343 с наноразмерным алмазом в фосфатном буфере (рН 7.4) в присутствии 5% ДМСО; 4 – наноразмерный алмаз в фосфатном буфере (рН 7.4) в присутствии 5% ДМСО; *б* – спектры возбуждения флуоресценции: 1 и 2 – Кумарин 343 в фосфатном буфере (рН 7.4) в присутствии 5% ДМСО и в этаноле соответственно (при длине волны регистрации $\lambda_{\text{рег}} = 525$ нм); 3 – конъюгат Кумарина 343 с наноалмазом в фосфатном буфере (рН 7.4) в присутствии 5% ДМСО, $\lambda_{\text{рег}} = 500$ нм.

даются сдвиги спектральных полос и исчезновение пика поглощения в области 420 нм, что свидетельствует об образовании новых оптических центров в изучаемых образцах. Приведенные спектры возбуждения (рис. 1б) и испускания (рис. 2) флуоресценции также указывают на существенные изменения в природе излучающих центров при комплексообразовании.

На рис. 3 показаны спектры ЭПР исследованных в настоящей работе алмазных наноконплексов с Кумарином 343 без освещения и при освещении ртутно-кварцевой лампой ДРШ-1000 через светофильтры УФС-5 (250–380 нм) и БС-6 (>320 нм) в течение 8 мин, и, как видно, существенного различия в этих спектрах не наблюдается. Таким образом, облучение алмазных наноконплексов не влияет на сигналы ЭПР (последние связывают с наличием дефектов в структуре синтетических алмазных частиц детонационного происхождения [11]) и, следовательно, не приводит к появлению новых парамагнитных центров.

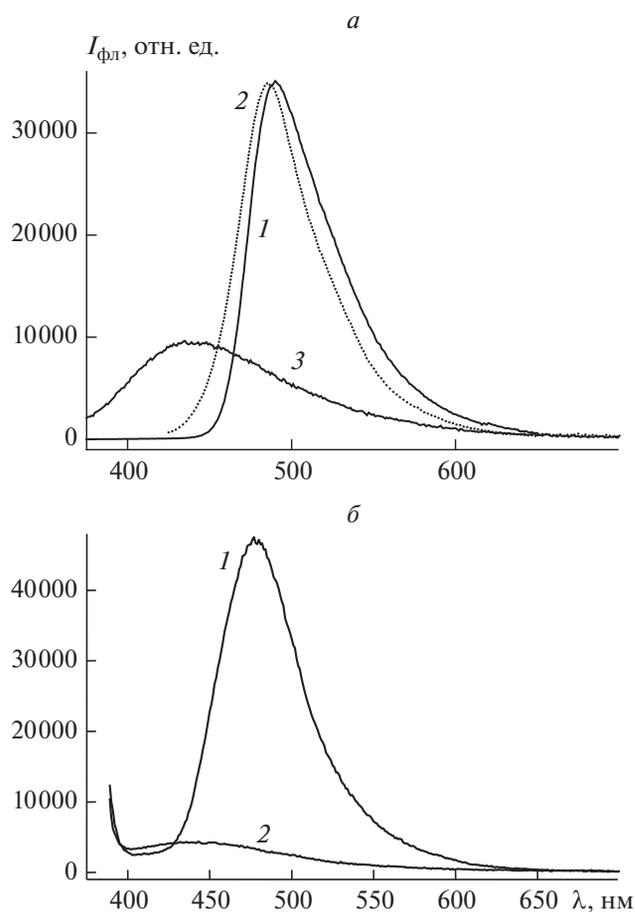


Рис. 2. *a* – Спектры флуоресценции: 1 и 2 – Кумарин 343 в фосфатном буфере (рН 7.4) в присутствии 5% ДМСО и в этаноле соответственно; 3 – конъюгат Кумарина 343 с наноразмерным алмазом в фосфатном буфере (рН 7.4) в присутствии 5% ДМСО (при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб}} = 310$ нм); *б* – спектры флуоресценции: 1 – Кумарин 343 в этаноле, 2 – конъюгат Кумарина 343 с наноразмерным алмазом в фосфатном буфере (рН 7.4) в присутствии 5% ДМСО ($\lambda_{\text{возб}} = 370$ нм).

Характеристика наноразмерных алмазов и клеточной культуры по данным электронной микроскопии

Образцы алмазных наночастиц представляют собой порошок серого цвета. Диаметры отдельных наночастиц составляют от 4 до 25 нм. В воде наночастицы формируют неустойчивую суспензию и оседают примерно через 5 мин после суспендирования. Также алмазные наночастицы могут образовывать агрегаты, как видно из рис. 4а. Кристаллическая решетка наноразмерных алмазов хорошо видна на рис. 4б.

Клеточная культура ТНР-1 – суспензионная культура, используемая для моделирования процессов фагоцитоза. Клетки в суспензии размерами 10–20 мкм имеют шарообразную форму

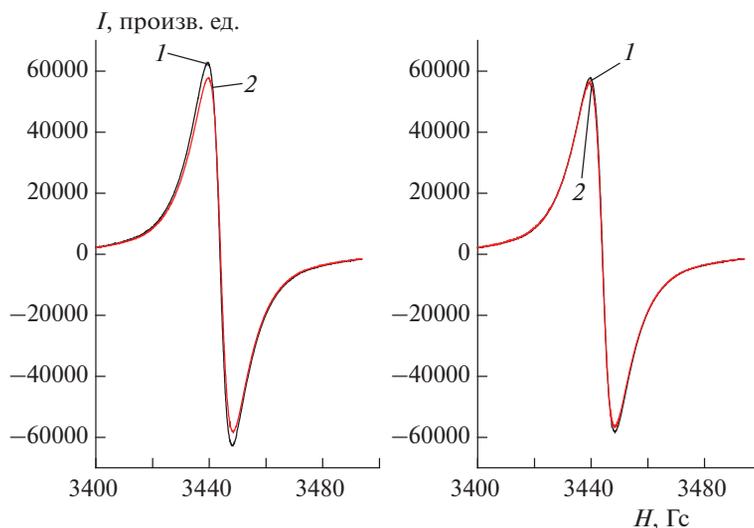


Рис. 3. Спектры ЭПР наноконплексов алмазов при 77 К и облучении лампой ДРШ-1000 через светофильтры УФС-5 (250–380 нм) – слева и БС-6 (>320 нм) – справа в течение 8 мин (1) в сравнении со спектром ЭПР необлученных образцов (2).

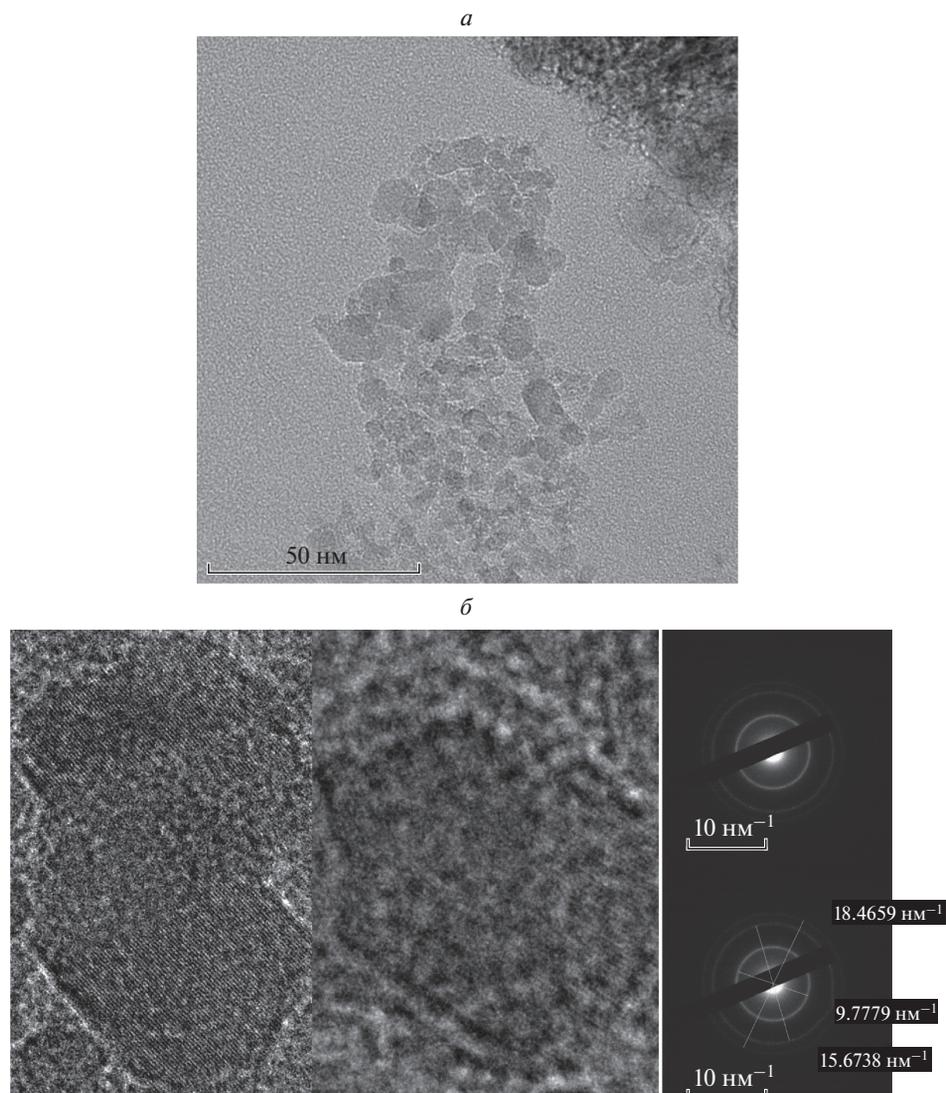


Рис. 4. *a* – Внешний вид алмазных наночастиц, *б* – кристаллическая решетка наноразмерных алмазов (слева) с кольцами электронограммы (справа). Трансмиссионная аналитическая электронная микроскопия.

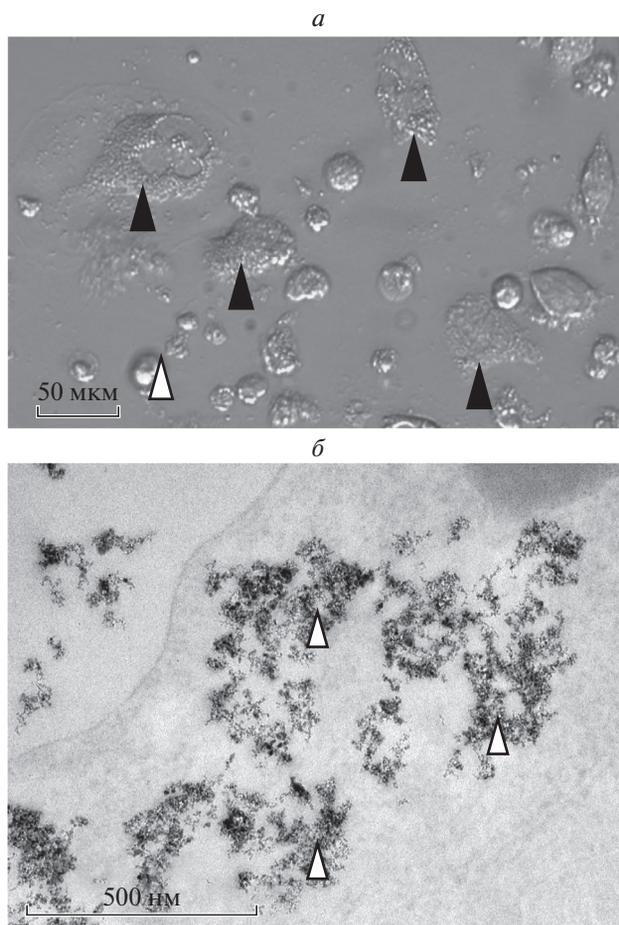


Рис. 5. *a* – Клетки линии THP-1 на десятые сутки инкубации с суспензией алмазных наноконкомплексов с Кумарином 343 (темными стрелками показаны клетки, светлой – агрегат наночастиц); *б* – интернализованные наночастицы (стрелками показаны кластеры алмазных наноконкомплексов с Кумарином 343. Трансмиссионная электронная микроскопия.

(не показаны). В суспензии присутствуют преимущественно одиночные клетки, способные, тем не менее, агрегироваться в кластеры. Добавление форболового эфира к суспензии клеток в итоговой концентрации (10^{-7} М) индуцирует макрофагальную дифференцировку, клетки прикрепляются к субстрату, распластываются и формируют отростки. На третьи сутки после добавления форболового эфира в культуральную среду наблюдаются многочисленные адгезировавшие клетки. Также часть клеток может приобретать вытянутую, часто веретеновидную форму и иметь длинные отростки либо распластанную округлую форму без отростков. Часть клеток сохраняет моноцитоподобную форму.

Внутриклеточная локализация алмазных наночастиц

На десятые сутки после инкубации клеток с алмазными наночастицами стало видно, что клетки имеют морфологию, несколько отличающуюся от морфологии контрольных макрофагов – большая

часть клеток имеет сильно зернистую цитоплазму, клетки приобретают более округлую форму. Также наблюдались крупные агрегаты непоглощенных наночастиц (рис. 5*a*). На снимках срезов клеток, полученных с помощью ТЭМ, видны поглощенные макрофагами алмазные наночастицы (рис. 5*б*).

Итак, в работе установлено, что алмазные наночастицы эффективно фагоцитируются макрофагами и легко детектируются внутри клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексообразование наноразмерных алмазов с Кумарином 343 приводит к существенному изменению спектрально-люминесцентных свойств люминофора, позволяющему различать его свободные и связанные молекулы в разнообразных системах, включая живые клетки. Эффективное фагоцитирование изученных в настоящей работе наноконкомплексов клетками и их легкая визуализация внутри клеток говорят о том, что такие ком-

плексы можно использовать для переноса в клетки фотоуправляемых агентов, включая терапевтические.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-53-00038 Бел_а) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Ф18Р-206).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пепекин В.И. // Хим. физика. 2010. Т. 29. № 9. С. 52.
2. Анисичкин В.Ф. // Хим. физика. 2016. Т. 35. № 6. С. 30.
3. Гурьев Д.Л. // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 11. С. 57.
4. Olszyna M., Debrassi A., Üzum C. et al. // Adv. Funct. Mater. 2019. V. 29. 1805998.
5. Lapina V.A., Pavich T.A., Pershukevich P.P. et al. // J. Phys. Org. Chem. 2017. V. 30. № 9. e3731.
6. Зак П.П., Лапина В.А., Павич Т.А. и др. // Успехи химии. 2017. Т. 86. № 9. С. 831.
7. Hannstein I., Mkandawire M., Rodel G. et al. // Materialpruefung. 2009. V. 51. № 10. P. 659.
8. Лапина В.А., Воробей А.В., Павич Т.А. и др. // ЖПС. 2013. Т. 80. № 3. С. 427.
9. Лапина В.А., Бушук С.Б., Павич Т.А. и др. // Там же. 2016. V. 83. № 3. С. 347.
10. Лапина В.А., Павич Т.А., Першукевич П.П. // Оптика и спектроскопия. 2017. Т. 122. № 2. С. 76.
11. Самсоненко Ч.Д., Соболев Е.В. // Письма в ЖЭТФ. 1967. Т. 5. Вып. 6. С. 304.