

Studium interakce kvantových teček s nádorovými buňkami pomocí fluorescenční mikroskopie

Iva Blažková^a, Pavel Kopel^{a,b}, Markéta Vaculovičová^{a,b}, Vojtěch Adam^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

Study of the interaction of quantum dots with tumor cells by fluorescence microscopy

This review is aimed on the interaction of quantum dots with tumor cells by fluorescence microscopy, we analyze the possibilities of the usage of QDs in tumor cell detection and visualization by fluorescence microscopy. QDs are fluorescent nanoparticles with good fluorescence properties. Specifically modified QDs can be targeted to the tumor tissue. QDs can be modified by antibodies, proteins, carbohydrates etc. For the use of QDs in biological applications, their solubility in water, stability and biocompatibility is important. Fluorescence microscopy is a good tool to observe interaction of QDs with cells and enable direct differentiation of normal and tumor cells.

Přijato k publikování: 11. 8. 2014

Klíčová slova: buňky; fluorescence; kvantové tečky; mikroskopie

Úvod

Ačkoli jsou velké pokroky v diagnostice a léčbě nádorových onemocnění, časná detekce nádorového bujení je stále problematická. Kvantové tečky (QDs) jsou nanočástice, jež mají výborné fotoluminiscenční vlastnosti a skrývají velký potenciál pro využití v detekci nádorových onemocnění a další biomedicínské aplikace. Jejich široké absorpční spektrum a úzké emisní spektrum je činí výbornými fluorescenčními značkami¹. Fluorescenční vlastnosti QDs mohou být úspěšně využity k zobrazování nádorových buněk i k *in situ* vyšetřování nádorové tkáně². Výhodou zobrazovacích metod je především neinvazivní vyšetření tkáně³.

Ke studiu interakce různě modifikovaných QDs s buňkami je nejčastěji užívána fluorescenční mikroskopie⁴. Intravitální mikroskopie se v posledních několika desetiletích stává stále populárnější, protože poskytuje informace o komplexních biologických procesech v reálném čase a vysokém rozlišení. Technologické pokroky, které umožňují proniknutí hluboko do živých tkání, představuje například vývoj konfokální a dvoufotonové mikroskopie.

K tomu se přidává studium nových fluoroforů, které umožní jasné značení buněk a tkání a tím umožní efektivní zobrazování⁵. Fluorescenční mikroskopie může být využita ke studiu vnitřních struktur buněk, transkripční aktivity, lokalizace interakcí a stability proteinů a celé řady dějů v buňkách⁶.

QDs mohou být svázány s různými nanočásticemi, které zajistí jejich zacílení do nádorových buněk⁷. K tomu, aby mohly být QDs užívány jako fluorescenční značky v medicíně je důležitá jejich rozpustnost ve vodě, vysoká biokompatibilita a dobré fluorescenční vlastnosti, které umožní jejich detekci i hluboko v tkáni. QDs emitující v oblasti infračerveného záření lépe pronikají tkání a jsou tedy pro biologické aplikace vhodnější. Kvantové tečky vykazují oproti organickým fluoroforům lepší fotostabilitu. CdTe QDs modifikované merkaptopropionovou kyselinou (MPA) s emisním maximem 640 nm vykazovaly v porovnání s rhodaminem 6G, po 200 minutách působení laserového paprsku (526 nm) jen o 5 % nižší intenzitu fluorescence, zatímco v případě rhodaminu byl pokles 50 %⁸. Toxicita QDs může být snížena jejich

povrchovou modifikací, například pokrytím L-cysteinem nebo manózou⁸. K tomu, aby mohly být QDs použity k léčbě nádorových onemocnění je nutná jejich funkcionalizace (protilátky, protein G, kyselina listová), aby došlo k zacílení léčiva do nádorové tkáně⁸. Také bylo zjištěno, že CdSe QDs vykazují inhibiční efekt vůči ROCK (Rho asociované kináze) v nádorových buňkách karcinomu děložního hrdla a tím tlumí progresi nádoru⁹.

QDs mohou být povrchově modifikovány polyethylenglykolem (PEG), který snižuje jejich cytotoxicitu a genotoxicitu a zajistí vyšší biokompatibilitu¹⁰. QDs se 40% pokryvem vykazovaly nejlepší vlastnosti, byla u nich pozorována dobrá disperze ve vodě, nízká tvorba agregátů a výborná fluorescence¹¹. VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) je exprimován některými nádorovými buňkami za účelem angiogeneze a výživy nádoru¹². Těto schopnosti nádorových buněk využili Sun et al. k zacílení QDs na jaterní nádorové buňky HepG2, které exprimují VEGF. Po navázání anti-VEGF na QDs, byla pozorována pomocí fluorescenční mikroskopie podstatně vyšší akumulace těchto QDs v nádorových jaterních buňkách, nežli v buňkách VEGF neexprimujících¹¹. CdTe QDs funkcionalizované β -Cyclodextrinem (β -CD) pro detekci amantadinu (AD) se po inkubaci s HepG2 buňkami koncentrují v cytoplazmě buněk a mohou sloužit jako biomarker AD v nádorových buňkách. AD je antivirotikum používané především proti chřipkovému viru A a dále také pro léčbu Parkinsonovy nemoci¹³. Detekce je založena na fluorescenčním rezonančním přenosu energie (FRET) mezi QDs a rhodaminem. Rhodamin může vstupovat do dutiny cyklodextrinu a tím může docházet k FRET, pokud toto místo obsadí AD, FRET nenastává¹⁴.

Funkcionalizace QDs

K zobrazování, cílení a třídění buněk lze použít QDs vázané s magnetickými částicemi¹⁵. Tyto částice mohou být dále za účelem vyšší biokompatibility pokryty PEG s karboxylovými, nebo aminovými skupinami (amino PEG). Bylo pozorováno, že patnáct dní po aplikaci QDs s amino PEG byla pozorována značná

akumulace v játrech, slezině a ledvinách a nebyla detekována významná toxicita. Po vazbě s kyselinou listovou bylo pozorováno specifické zacílení do HeLa buněk¹⁶. Toxicita QDs může být snížena konjugací se sacharidy pomocí thioglykolové kyseliny. Použití sacharidů může také umožnit zacílení do nádorových buněk¹⁷. Po pokrytí CdSe QDs D-manózou (QDs-Man), byla pozorována výrazná endocytóza QDs-Man HepG2 buňkami přes jejich manózové receptory. Takto modifikované QDs by mohly sloužit k detekci jaterních nádorových buněk¹⁸.

K cílení do nádorové tkáně může být použit peptid RGD, který vykazuje vysokou afinitu k $\alpha\beta$ 3 integrinu, jenž bývá exprimován v nádorových buňkách¹⁹. Sonda tvořená CdTe QDs konjugovanými s RGD (arginin-glycin-asparagová kyselina) a ¹⁸⁸Re může být použita k detekci nádoru pomocí fluorescenčního zobrazování a k zacílení radioaktivního ¹⁸⁸Re do nádorové tkáně (radioterapie). Tím umožňuje jak zobrazování, tak léčbu postižené tkáně. Tato sonda se dobře váže na lidské gliové buňky U87MG, které vykazují vysokou afinitu k RGD. Byl detekován nárůst koncentrace sondy v gliových buňkách s prodlužující se inkubační dobou. Po 6 hodinové inkubaci bylo detekováno, z aplikovaného množství 87,3 % v nádorových buňkách²⁰. CdTe QDs mohou být použity také jako fotosenzitivní látka ve fotodynamické terapii, což potvrdila in vitro fotodynamická terapie leukemických nádorových buněk (HL 60)²¹.

QDs díky svým dobrým fluorescenčním vlastnostem mají velký potenciál v detekci nádorových buněk a dalších biologických aplikacích. Po jejich zacílení specifickými protilátkami, proteiny, sacharidy, atd. mohou být úspěšně dopraveny do nádorových buněk a tím úspěšně odlišeny od zdravé tkáně. Fluorescenční mikroskopie umožňuje detekci QDs v buňkách a proto je výborným nástrojem pro studium zacílení QDs do buněk.

Tato práce byla financována z projektu NANOLABSYS CZ.1.07/2.3.00/20.0148.

The authors declare they have no potential conflicts of interests concerning drugs, pro-

ducts, services or another research outputs in this study.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

Literatura

- Hong, L.; Wang, Z.; Yuan, L.; Tan, J.H.; Wang, L.X.; Qu, G.B.; Zhang, D.Q.; Lin, R.H.; Liu, S.J. Subcellular Distribution of CdSe Quantum Dots (QDs) in Breast Cancer Cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2012, 12, 365-367.
- Hu, W.Q.; Fang, M.; Zhao, H.L.; Yan, S.G.; Yuan, J.P.; Peng, C.W.; Yang, G.F.; Li, Y.; Li, J.D. Tumor invasion unit in gastric cancer revealed by QDs-based in situ molecular imaging and multispectral analysis. *Biomaterials*. 2014, 35, 4125-4132.
- Qu, L.Z.; Deng, D.W.; Wang, J.; Gu, Y.Q. DOX-CONJUGATED HIGH-QUALITY AgZnInS QDs FOR REVERSAL OF MULTIDRUG RESISTANCE. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. 2014, 7.
- Shibu, E.S.; Ono, K.; Sugino, S.; Nishioka, A.; Yasuda, A.; Shigeri, Y.; Wakida, S.; Sawada, M.; Biju, V. Photouncaging Nanoparticles for MRI and Fluorescence Imaging in Vitro and in Vivo. *Acs Nano*. 2013, 7, 9851-9859.
- Progatzky, F.; Dallman, M.J.; Lo Celso, C. From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. *Interface Focus*. 2013, 3.
- Shapiro, L.; McAdams, H.H.; Losick, R. Why and How Bacteria Localize Proteins. *Science*. 2009, 326, 1225-1228.
- Ou, J.; Wang, F.; Huang, Y.J.; Li, D.S.; Jiang, Y.M.; Qin, Q.H.; Stachurski, Z.H.; Tricoli, A.; Zhang, T.N. Fabrication and cyto-compatibility of Fe₃O₄/SiO₂/graphene-CdTe QDs/CS nanocomposites for drug delivery. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2014, 117, 466-472.
- Gallo, J.; Garcia, I.; Genicio, N.; Penades, S. CdTe-Based QDs: Preparation, Cytotoxicity, and Tumor Cell Death by Targeting Transferrin Receptor. *Particle & Particle Systems Characterization*. 2014, 31, 126-133.
- Chen, L.Q.; Qu, G.B.; Zhang, C.W.; Zhang, S.P.; He, J.Y.; Sang, N.; Liu, S.J. Quantum dots (QDs) restrain human cervical carcinoma HeLa cell proliferation through inhibition of the ROCK-c-Myc signaling. *Integrative Biology*. 2013, 5, 590-596.
- Ju, L.; Zhang, G.L.; Zhang, C.; Sun, L.; Jiang, Y.; Yan, C.L.; Duerksen-Hughes, P.J.; Zhang, X.; Zhu, X.Q.; Chen, F.F.; Yang, J. Quantum dot-related genotoxicity perturbation can be attenuated by PEG encapsulation. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013, 753, 54-64.
- Sun, T.; Li, K.; Li, Y.P.; Li, C.J.; Zhao, W.O.; Chen, L.; Chang, Y.L. Optimizing conditions for encapsulation of QDs by varying PEG chain density of amphiphilic centipede-like copolymer coating and exploration of QDs probes for tumor cell targeting and tracking. *New Journal of Chemistry*. 2012, 36, 2383-2391.
- Wang, Y.; Cho, S.G.; Wu, X.; Siwko, S.; Liu, M. G-Protein Coupled Receptor 124 (GPR124) in Endothelial Cells Regulates Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Induced Tumor Angiogenesis. *Current Molecular Medicine*. 2014, 14, 543-554.
- Arakelyan, R.K.; Nerobkova, L.N.; Katunina, E.A.; Valdman, E.A.; Kapitsa, I.G.; Voronina, T.A.; Avakyan, G.N.; Gusev, E.I. Functional brain activity in patients with Parkinson's disease during amantadin-sulfate therapy. *Zhurnal Nevrologii I Psikhiiatrii Imeni S S Korsakova*. 2005, 105, 17-21.
- Ai, X.Z.; Niu, L.; Li, Y.Y.; Yang, F.P.; Su, X.G. A novel beta-Cyclodextrin-QDs optical biosensor for the determination of amantadine and its application in cell imaging. *Talanta*. 2012, 99, 409-414.
- Ahmed, S.R.; Dong, J.H.; Yui, M.; Kato, T.; Lee, J.; Park, E.Y. Quantum dots incorporated magnetic nanoparticles for imaging colon carcinoma cells. *Journal of Nanobiotechnology*. 2013, 11.
- Singh, N.; Charan, S.; Sanjiv, K.; Huang, S.H.; Hsiao, Y.C.; Kuo, C.W.; Chien, F.C.; Lee, T.C.; Chen, P.L. Synthesis of Tunable and Multifunctional Ni-Doped Near-Infrared QDs for Cancer Cell Targeting and Cellular Sorting. *Bioconjugate Chemistry*. 2012, 23, 421-430.
- Kikkeri, R.; Lepenies, B.; Adibekian, A.; Laurino, P.; Seeberger, P.H. In Vitro Imaging and in Vivo Liver Targeting with Carbohydrate Capped Quantum Dots. *Journal of the American Chemical Society*. 2009, 131, 2110+.
- Jiang, M.X.; Chen, Y.; Kai, G.Q.; Wang, R.J.; Cui, H.L.; Hu, M.L. Preparation of CdSe QDs-carbohydrate Conjugation and its Application for HepG2 Cells Labeling. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2012, 33, 571-574.
- Temming, K.; Schifferers, R.M.; Molema, G.; Kok, R.J. RGD-based strategies for selective delivery of therapeutics and imaging agents to the tumour vasculature. *Drug Resistance Updates*. 2005, 8, 381-402.
- Li, Z.; Zhang, G.X.; Shen, H.; Zhang, L.; Wang, Y.X. Synthesis and cell uptake of a novel dualmodality Re-188-HGRGD (D) F-CdTe QDs probe. *Talanta*. 2011, 85, 936-942.
- Wang, J.; Chen, L.; Jiang, F.; Xiong, J.W. Experimental Resarch of Destruction of Leukemia Tumor Cells HL60 by QDs-CdTe-based PDT Combined with Antibiotics in Vitro, in: B. Tan (Ed.), *Future Materials Engineering and Industry Application*, Trans Tech Publications Ltd, Stafa-Zurich, 2012, pp. 205-208.



Článek je volně šiřitelný pod licencí Creative Commons (BY-NC-ND). Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit a používat pro komerční účely.