

INTERACȚIUNEA CELULELOR VII CU NANOSTRUCTURI DIN COMPUȘI SEMICONDUCTORI

Tudor Braniște, drd

Universitatea Tehnică a Moldovei

INTRODUCERE

În acest articol vor fi prezentate rezultatele interacțiunii nanoparticulelor în baza materialelor semiconductoare, cum ar fi nitrura de galiu – GaN, oxidul de zinc – ZnO și $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ cu celulele vii. GaN este un material semiconductor utilizat pe larg în optoelectronică și în electronica de putere. Stabilitatea chimică a materialului, GaN, este factorul principal ce determină biocompatibilitatea acestuia [1,2]. Materialul este atractiv pentru aplicațiile biomedicale datorită efectului piezoelectric, care la dimensiuni nanometrice este mai pronunțat decât în materialul masiv [3,4]. Ingineria biomedicală, în special cea tisulară este un domeniu nou, dar cu un potențial vast în domeniul dezvoltării organelor artificiale și cel al tratamentului direcționat. În această lucrare vor fi abordate aspecte precum viabilitatea celulelor incubate în medii suplimentate cu diferite tipuri de nanoparticule și influența de la distanță asupra celulelor vii prin intermediul câmpului magnetic (ghidarea celulelor vii marcate cu nanoparticule).

1. OBȚINEREA ȘI CARACTERIZAREA NANOPARTICULELOR

Nanoparticulele în baza GaN au fost obținute la creșterea prin metoda HVPE (Hydride Vapour Phase Epitaxy) după cum a fost descris anterior [5,6]. Prepararea nanoparticulelor de GaN include câteva etape. Inițial pe un strat subțire de nanoparticule de ZnO sau $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ cu dimensiunile mai mici de 50 nm sunt crescute straturi subțiri de GaN prin epitaxia din faza hidridă de vapori. Ulterior stratul de ZnO este descompus, astfel materialul obținut are forma nanoparticulelor inițiale, dar compoziția chimică diferită. În reactor, la temperatură ridicată la prima etapă se formează GaCl_3 ca urmare a reacțiilor chimice între HCl gazos și Ga lichid. Apoi, GaCl_3 și NH_3 reacționează în zona de reacție, unde la începutul procesului temperatura este menținută la 600°C timp de 10 min pentru a iniția formarea germenilor de GaN pe suprafața nanoparticulelor de ZnO sau $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ și

apoi ridicată până la 800°C timp de încă 10 min pentru a crește un strat de GaN pe nanoparticulele de ZnO sau $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$. La 800°C, împreună cu creșterea GaN, nucleul de ZnO se descompune datorită fluxului de hidrogen din camera de reacție.

Pentru creșterea GaN în calitate de substrat au fost utilizate două tipuri de materiale și anume nanoparticule de ZnO cu dimensiunile mai mici de 50 nm și nanoparticule de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ cu dimensiunile mai mici de 100 nm. Datorită faptului că nitrura de galiu nu poate fi obținută din topitură prin metode clasice, pentru creșterea cristalelor este necesară utilizarea substraturilor în baza altor materiale. De obicei, pentru creșterea GaN, în calitate de substrat se utilizează safirul, care la rândul său, datorită asimetriei mari între rețelele cristaline (~16%) duce la creșterea unui material imperfect, cu o densitate mare de dislocații. Oxidul de zinc este un material asemănător cu nitrura de galiu, având banda interzisă largă (~3.4 eV la 300 K), rețeaua cristalină de tip wurzite și o diferență între parametrii rețelei cristaline de doar 2.2% [7], astfel, ZnO este un candidat perfect pentru creșterea GaN. Creșterea plachetelor de dimensiuni mari nu ar fi posibilă datorită instabilității substratului la temperaturi ridicate, însă pentru aplicațiile unde este necesar un strat de sacrificiu, oxidul de zinc este candidatul cel mai potrivit pentru creșterea GaN. De menționat că în ultimii ani au fost dezvoltate mai multe metode cost efective de obținere a celor mai variate tipuri de nanoarhitecturi în baza ZnO.

În figura 1 este prezentată imaginea SEM a nanoparticulelor utilizate în investigațiile interacțiunii cu celulele vii. Figura 1 (a) prezintă nanoparticulele inițiale de ZnO dimensiunile cărora sunt mai mici de 50 nm, iar în figura 1 (b) sunt prezentate nanoparticulele de GaN crescute pe nanoparticulele de ZnO. După procesul de creștere a unui strat subțire de GaN, miezul nanoparticulelor de ZnO a fost descompus în flux de hidrogen la temperatura de 850°C. Compoziția chimică a nanomaterialului sintetizat a fost determinată prin metoda dispersiei energiei razelor X (EDX – Energy Dispersive X-ray Analysis). S-a determinat că în materialul sintetizat există o cantitate de oxid de zinc (~7%), care nu a fost complet înlăturată în timpul procesului de sinteză. Încercările ulterioare

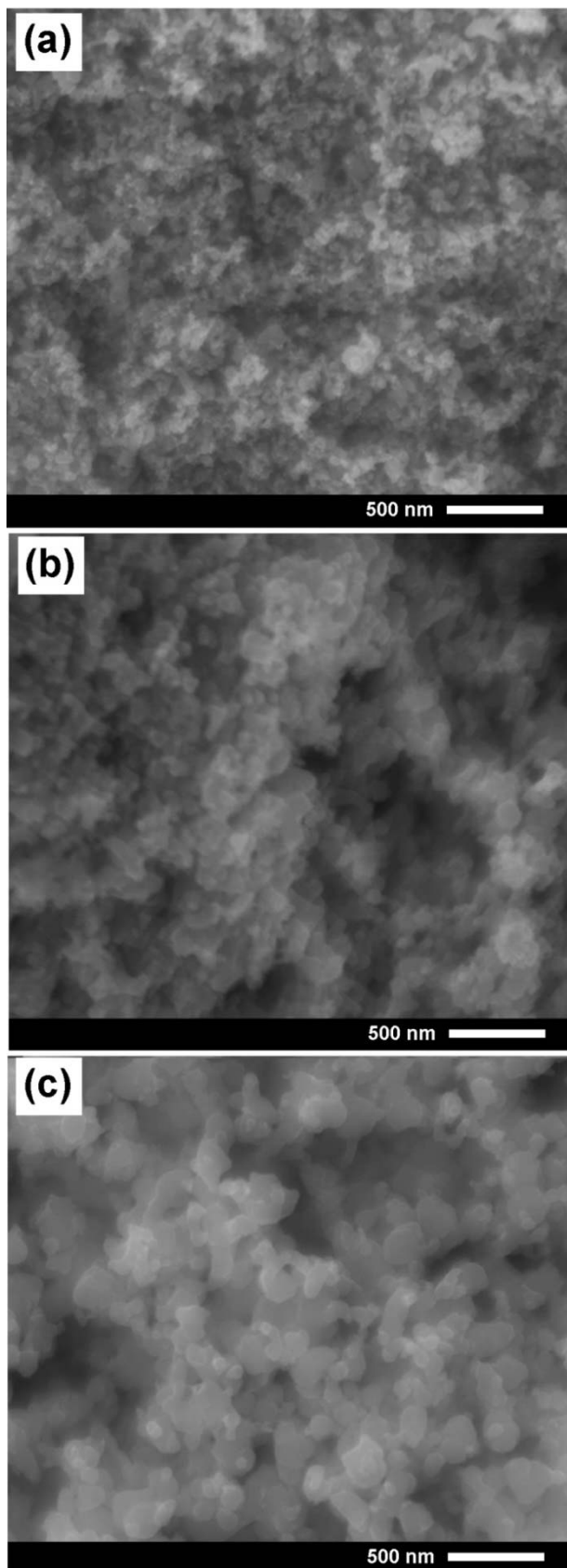


Figura 1. Imaginea SEM a nanoparticulelor de ZnO: (a) GaN crescut pe ZnO (b) și GaN crescut pe nanoparticule de Fe₂O₄Zn (c).

de înlăturare completă a stratului de sacrificiu de ZnO prin tratarea la temperatură mai înaltă decât

temperatura de creștere a materialului (~950°C) și la tratarea suplimentară în flux de hidrogen au permis reducerea cantității de oxid de zinc în interiorul nanostructurilor de GaN până la mai puțin de 1%. În figura 1 (c) este prezentată imaginea SEM a nanoparticulelor de Fe₂O₄Zn acoperite cu GaN. Investigațiile EDX după creșterea stratului de GaN au demonstrat micșorarea concentrației atomice de Zn și O, totodată, a fost observată creșterea concentrației fierului în compusul obținut, astfel fiind îmbunătățite proprietățile paramagnetice ale nanoparticulelor. Din imagini se poate observa că dimensiunile nanoparticulelor sunt puțin mai mari după creșterea stratului de GaN.

2. CULTIVAREA CELULELOR ENDOTELIALE CU NANOPARTICULE

Celulele endoteliale de proveniență porcină au fost incubate împreună cu nanoparticulele obținute. La prima etapă a fost identificat gradul de toxicitate al materialului, pentru ca mai apoi să se efectueze procesele de stimulare a celulelor de la distanță sau ghidarea acestora.

Celulele endoteliale de origine porcină au fost izolate prin răzuirea celulelor de pe aortă în condiții sterile după cum este descris în [8]. Celulele au fost cultivate în mediu de cultură celulară EGM-2 (Lonza) și incubate într-un incubator standard la 37°C și 5% CO₂. Toate experimentele au fost efectuate cu celule cu vârsta cuprinsă între pasajul 5 și 9. Înainte de efectuarea experimentelor celulele au fost marcate fluorescent prin transducție lentivirală [9], astfel încât emisia fluoroforă să fie în domeniul spectral verde.

Celulele endoteliale porcine au fost incubate timp de trei zile cu diferite concentrații de nanoparticule de GaN (10 μg/ml, 50 μg/ml și 100 μg/ml). Nanoparticulele de GaN crescute pe ZnO sau pe Fe₂O₄Zn, suspendate în mediu de cultură celulară EGMTM-2 au fost incubate cu celulele endoteliale (25000 celule/godeu în 1 ml de mediu) timp de trei zile în cutii de creștere celulară cu 24 de godeuri într-un incubator standard la 37°C și 5% CO₂. Aceleași concentrații de nanoparticule de ZnO pur de aceleași dimensiuni ca și nanoparticulele de GaN, servesc drept control pozitiv, iar celulele incubate în mediu fără nanoparticule - control negativ. În figura 2 este prezentat numărul de celule după trei zile de incubare cu diferite concentrații de nanoparticule de GaN și ZnO.

Celulele au fost numărate cu ajutorul softului DotCount v.1.2, fiind selectate trei câmpuri de

vedere distincte pentru fiecare godeu. Pentru vizualizare, nucleele celulelor au fost marcate cu DAPI după fixarea prealabilă cu soluție de 2% de paraformaldehidă.

Din figura 2 se observă că nanoparticulele de ZnO au un efect citotoxic evident la concentrații mai mari de 50 $\mu\text{g/ml}$. Toxicitatea nanoparticulelor de ZnO se datorează instabilității chimice a materialului și creșterii concentrației ionilor de Zn^{2+} , ca urmare a dizolvării acestuia în mediul de cultură. Celulele incubate cu nanoparticule de GaN își continuă procesele de proliferare chiar și la creșterea concentrației nanoparticulelor în mediul de cultură al celulelor incubate.

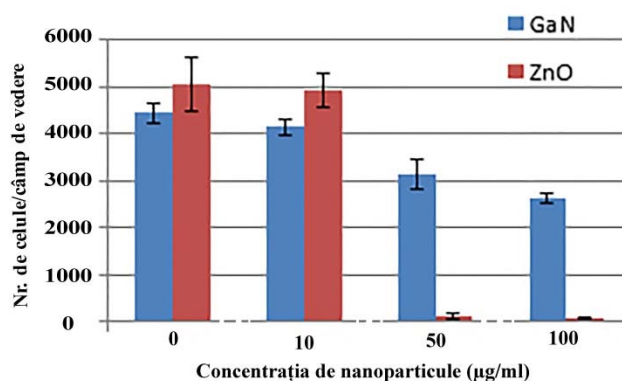


Figura 2. Numărul mediu de celule într-un câmp de vedere la incubarea cu diferite cantități de nanoparticule de GaN și ZnO.

Nanoparticulele de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ sunt cu mult mai puțin toxice la interacțiunea cu celulele endoteliale decât nanoparticulele de ZnO. În urma investigațiilor efectuate, se observă că materialul rezultat în urma creșterii stratului de GaN în jurul nanoparticulelor de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ încetinește procesele de proliferare celulară odată cu creșterea concentrației nanoparticulelor în mediul de cultură.

În figura 3 sunt prezentate imaginile optice (a) și (b), respectiv imaginea TEM (c) ale celulelor endoteliale cultivate timp de 3 zile împreună cu nanoparticule de GaN și $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$. Figura 3 (a) prezintă imaginea optică preluată cu ajutorul microscopului cu fluorescență de la grupul de control, unde celulele endoteliale au fost incubate cu mediu de cultură fără careva adaosuri de nanoparticule. În figura 3 (b) sunt prezentate celulele endoteliale incubate în mediu de cultură EGM-2 suplimentat cu 100 $\mu\text{g/ml}$ de nanoparticule de GaN. La mărirea concentrației de nanoparticule în mediul de cultură, activitatea celulelor endoteliale este perturbată, proliferarea acestora fiind încetinită sau chiar stopată. Mecanismele descreșterii numărului de celule la mărirea concentrației nanoparticulelor libere în mediul de cultură încă nu a fost pe deplin înțeles. O ipoteză ar fi că celulele sunt afectate de către încărcătura

mecanică a nanoparticulelor asimilate, astfel procesul de migrație este încetinit, iar rata de proliferare este micșorată odată cu mărirea cantității de nanoparticule încorporate [10]. Se consideră că raportul mare al suprafeței nanoparticulelor față de volumul lor influențează celulele să genereze specii reactive de oxigen (ROS – Reactive Oxygen Species), care au un rol în moartea celulelor la concentrații ridicate ale nanoparticulelor chiar dacă materialul este biocompatibil și chimic stabil [11,12].

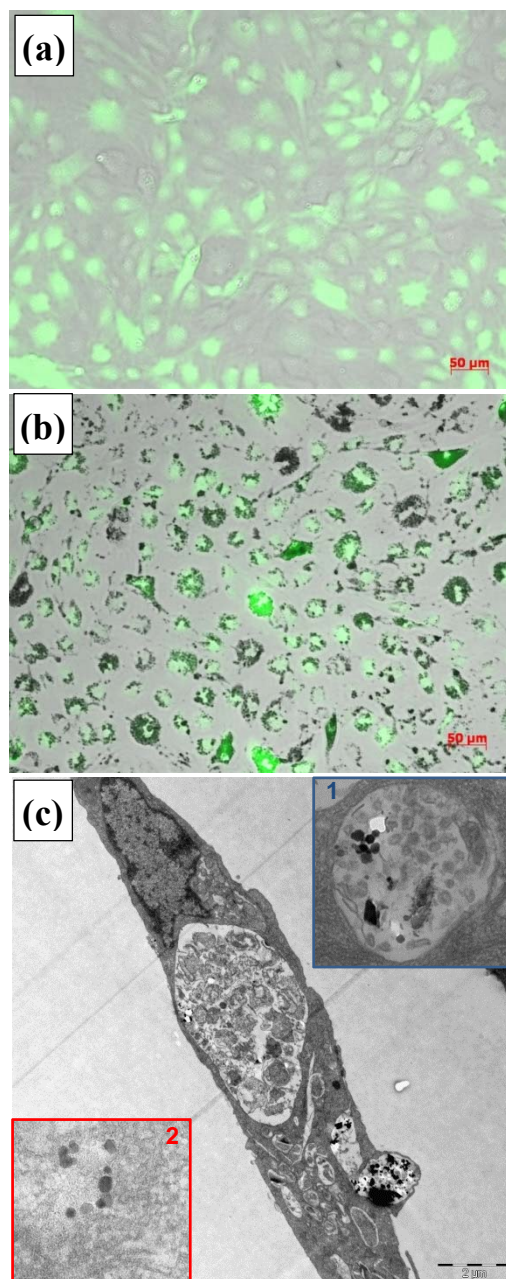


Figura 3. Imaginea optică a celulelor endoteliale după 3 zile de incubare în grupul de control: (a) și în grupul cu nanoparticule în baza GaN (b); (c) – imaginea TEM a unei secțiuni transversale a celulelor endoteliale după incubarea cu nanoparticule de GaN.

Asimilarea nanoparticulelor de către celulele endoteliale a fost observată și investigată în dinamică. Pentru aceasta celulele endoteliale au fost cultivate timp de 2 zile în mediul de cultură fără nanoparticule, iar când stratul de celule de pe suprafața vasului de cultură a atins 50% din confluență, mediul de cultură a fost înlocuit cu mediu proaspăt suplimentat cu nanoparticule în baza materialelor semiconductoare (ZnO, GaN și $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$). Imediat după ce mediul nou a fost adăugat, au fost efectuate imagini optice ale celulelor la fiecare 15 min. Din investigațiile efectuate a fost stabilit că nanoparticulele libere din mediul de cultură au fost absorbite de către celulele endoteliale la scurt timp după precipitarea acestora. Astfel, în decurs de 2 – 4 ore de la schimbul de medii, toate nanoparticulele sunt asimilate de către celulele endoteliale.

În figura 3 (c) este prezentată imaginea TEM (microscopia electronică cu transmisie) de la o celulă endotelială incubată timp de 24 h în mediu cu nanoparticule de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$. Pentru efectuarea măsurărilor TEM ale celulelor cultivate în mediu cu nanoparticule a fost realizat următorul protocol:

1. Celulele endoteliale se cultivă în cutii de 75 cm^2 în decursul unui interval de timp până când stratul de celule are confluența de $\sim 50\%$;

2. Se înlocuiește mediul de cultură cu mediu suplinit cu nanoparticule de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ sau GaN și se incubează timp de 24 h într-un incubator obișnuit la $5\% \text{ CO}_2$ și 37°C ;

3. Se înlocuiește mediul de cultură cu soluție de 2% de aldehidă glutarică timp de 2 h la temperatura de 4°C pentru fixarea celulelor, apoi se clătește de trei ori cu soluție de cacodilat de sodiu $\text{pH}=7,2$;

4. Soluția de cacodilat este înlocuită cu ferocianură de potasiu de 2,5% și tetraoxid de ostmiu 1% pentru 1 oră la temperatura camerei;

5. Spălarea și dehidratarea în acetonă la mărirea concentrației de la 30 la 100% în 5 trepte câte zece minute fiecare;

6. Incubarea peste noapte în soluție de acetonă și rășină epoxidică 50:50;

7. Incubarea timp de 4-5 ore în rășină epoxidică de 100%;

8. Uscarea timp de 2 zile la temperatura de 60°C ;

9. Tăierea feliilor subțiri de $\sim 50 \text{ nm}$ grosime și fixarea lor pe suporturile pentru TEM, care constau dintr-o plasă de Cu acoperită cu o peliculă ultrasubțire de carbon.

Analizând figura 3 (c) observăm că nanoparticulele de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ sunt asimilate în interiorul celulei prin încapsularea lor în vezicule. În imaginea inserată 1 din figura 3 (c) este prezentată o veziculă tipică în care sunt prezente

nanoparticulele de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ și distribuția acestora. Totodată, au fost identificate și nanoparticule libere în citoplasmă (imaginea inserată 2 din figura 3 (c)), însă cu mult mai puține comparativ cu nanoparticulele încapsulate în vezicule. Careva semne de penetrare a nanoparticulelor în nucleul celulelor endoteliale nu au fost observate.

Încapsularea nanoparticulelor în vezicule prezintă un avantaj în procesul de ghidare al acestora cu ajutorul câmpului magnetic, iar în consecință obținem ghidarea celulelor în mediile lichide de la distanță acționând asupra lor cu câmpul magnetic (vezi figura 4).

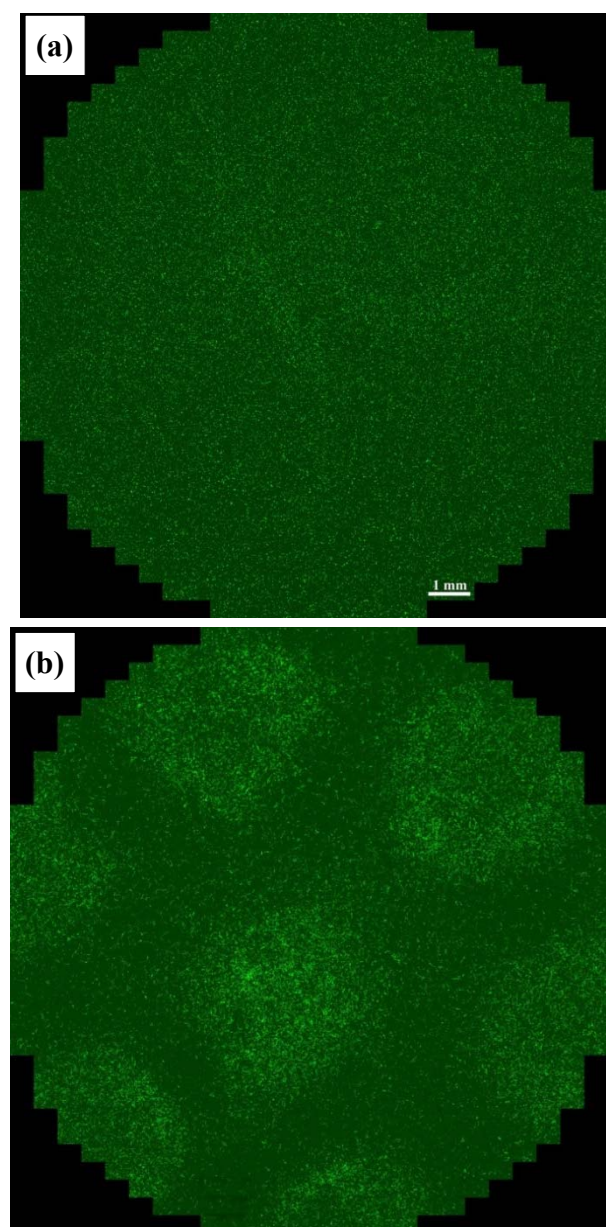


Figura 4. (a) Imaginea celulelor endoteliale marcate cu nanoparticule de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ și incubate în lipsa câmpului magnetic; în (b) este prezentată distribuția celulelor endoteliale marcate cu nanoparticule de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$ și incubate într-un gradient al câmpului magnetic.

Primele încercări de ghidare a celulelor endoteliale marcate cu nanoparticule cu proprietăți paramagnetice au fost efectuate cu ajutorul magneților permanenți fixați sub cutia unde sunt cultivate celulele endoteliale. În figura 4 este prezentată influența câmpului magnetic continuu asupra celulelor endoteliale marcate cu nanoparticule de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$. Inițial celulele au fost incubate în mediu de cultură fără de nanoparticule până la atingerea gradului de confluență de 50%. Apoi, mediul de cultură a fost înlocuit cu mediu suplinit cu nanoparticulele de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$, pentru 24 h, timp în care confluența stratului de celule endoteliale a ajuns la 100%. Celulele au fost pasajate prin clătirea cu PBS pentru înlăturarea reziduurilor de celule moarte sau nanoparticule neatașate, apoi a urmat detașarea stratului de celule prin tratarea lor cu enzime TripLE™ și resuspendarea acestora în mediul de cultură.

După pasajul celulelor marcate cu nanoparticule de $\text{Fe}_2\text{O}_4\text{Zn}$, cutiile cu celule sunt plasate pe o rețea de magneți permanenți ce creează un gradient continuu al câmpului magnetic. A fost observat că în decursul a câtorva ore după pasajare, celulele se aranjează pe suprafața cutiei de creștere în conformitate cu distribuția câmpului magnetic.

Pentru a determina dacă celulele aderente la substrat pot fi influențate cu ajutorul câmpului magnetic pentru a fi mișcate și ghidate spre direcția dorită a fost efectuat următorul experiment: după pasajarea celulelor endoteliale marcate cu nanoparticule cu proprietăți paramagnetice și incubarea lor timp de 24 h într-un câmp magnetic continuu, a fost modificată poziția magneților permanenți cu scopul de a transfera celulele în timpul proceselor de diviziune sau chiar de a le detașa de pe suprafața vasului. În figura 5 sunt prezentate imaginile optice ce confirmă imposibilitatea ghidării celulelor aderente la substrat cu aceeași intensitate a câmpului magnetic ca și în cazul celulelor libere în mediul de cultură. Observăm că odată aranjate pe suprafața cutiei de cultură, celulele nu mai pot fi mișcate cu ajutorul câmpului magnetic de aceeași intensitate ca și în cazul celulelor libere din mediul de cultură. Astfel, intensitatea câmpului magnetic necesară pentru a ghida o celulă ce plutește în lichid este cu mult mai mică decât intensitatea câmpului magnetic necesară pentru a deplasa o celulă care a aderat la substrat.

În rezultat, putem afirma că este posibilă ghidarea celulelor endoteliale marcate cu nanoparticule cu proprietăți paramagnetice. Aceste rezultate indică posibilitatea utilizării unei astfel de metode la ghidarea celulelor marcate prin fluidele organismului, cum ar fi sângele și direcționarea lor spre regiunile afectate ale organismului cu scopul

efectuării tratamentului pe cale biologică în detrimentul celei chimice.

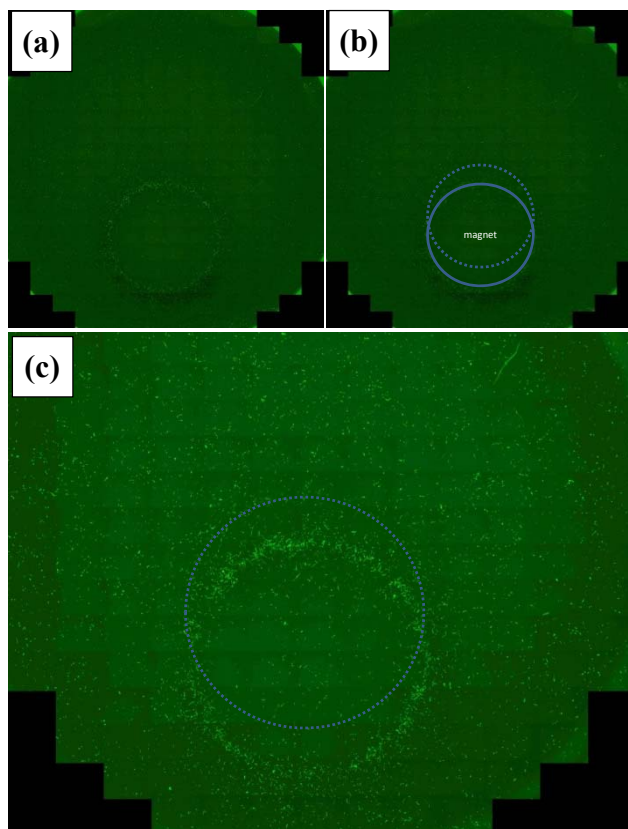


Figura 5. (a) *Imagina optică a celulelor endoteliale după 24 h de la pasajarea și incubarea într-un câmp magnetic continuu;* (b) *imaginea conceptuală de modificare a direcției câmpului magnetic prin mișcarea magneților permanenți;* (c) *imaginea optică a celulelor endoteliale după 24 h de la modificarea poziției magneților permanenți.*

Rezultatele sunt promițătoare pentru aplicațiile privind marcarea celulelor cu nanoparticule și manipularea ulterioară a funcționalității acestora sau ghidarea celulelor în organism [13]. Marcarea celulelor cu nanoparticule ar putea fi aplicată la tratarea afecțiunilor vasculare, prin injectarea nanoparticulelor în zone cu vascularizare ridicată, cum ar fi afecțiuni oculare, unde accesul direct este foarte anevoios și ar putea duce la distrugerea țesutului sănătos provocând afecțiuni ale văzului [14,15]. Terapiile celulare care cu ajutorul unui câmp electric sau magnetic exterior implică ghidarea celulelor endoteliale marcate către regiunile vasculare afectate ar putea accelera procesul de revascularizare prin promovarea integrării stratului endotelial. De menționat faptul că fiecare divizie celulară va reduce cu 50% numărul de nanoparticule încorporate într-o celulă, acțiunea mecanică a nanoparticulelor de GaN asupra unei singure celule se va diminua în timp.

CONCLUZII

În rezultatul investigării impactului nanoparticulelor semiconductoare asupra celulelor endoteliale s-a stabilit că activitatea celulelor endoteliale este influențată atât de tipul materialului cât și de concentrația acestuia în mediul de cultură. Astfel, nanoparticulele de ZnO, (<50 nm) sunt extrem de toxice la concentrații ce depășesc 50 μg/ml, iar nanoparticulele de GaN crescute pe substrat de sacrificiu de ZnO sunt tolerate de către celulele endoteliale fără a le fi influențată proliferarea la concentrații mici și cu încetinirea proceselor de proliferare celulară la creșterea concentrației nanoparticulelor în mediul de cultură. Nanoparticulele de Fe₂O₄Zn au un grad mediu de toxicitate atât în faza inițială cât și după creșterea stratului de GaN pe suprafața acestora.

A fost demonstrată posibilitatea ghidării celulelor endoteliale prin marcarea prealabilă a acestora cu nanoparticule cu proprietăți magnetice și plasarea acestora într-un gradient continuu al câmpului magnetic. Cercetările preliminare au demonstrat posibilitatea ghidării celulelor suspendate în mediul de cultură fără a fi influențată viabilitatea celulelor ca urmare a acționării asupra acestora cu câmpul magnetic.

Mulțumiri

Autorul aduce mulțumiri Serviciului de Schimb Academic German (DAAD) pentru bursa de cercetare pentru doctoranzi și tineri cercetători acordată la Universitatea de Medicină din or. Hannover, Germania. O parte a lucrului a fost efectuată cu suportul Consiliului Suprem pentru Știință și Dezvoltare Tehnologică al AȘM, grantul cu nr. 16.00353.50.08A.

Bibliografie

1. **Jewett S. A., Makowski M. S., Andrews B., Manfra M. J., Ivanisevic A.** *Acta Biomater.* 8, 728–733, 2012.
2. **Hofstetter M., Howgate J., Schmid M., Schoell S., Sachsenhauser M., Adigüzel D., Stutzmann M., Sharp I. D., Thalhammer S.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 424, 348–353, 2012.
3. **Agrawal R., Espinosa H. D.** *Nano Lett.* 11, 786–790, 2011.
4. **Minary-Jolandan M., Bernal R. A., Kuljanishvili I., Parpoil V., Espinosa H. D.** *Nano Lett.* 12, 970–976, 2012.

5. **Schuchardt A., Braniste T., Mishra Y.K., Deng M., Mecklenburg M., Stevens-Kalceff M.A., Raevschi S., Schulte K., Kienle L., Adelung R., Tiginyanu I.** *Three-dimensional Aerographite-GaN hybrid networks: Single step fabrication of porous and mechanically flexible materials for multifunctional applications.* *Scientific Reports.* 5, 8839, 2015.
6. **Braniste T., Tiginyanu I., Horvath T., Raevschi S., Cebotari S., Lux M., Haverich A., Hilfiker A.** *Viability and proliferation of endothelial cells upon exposure to GaN nanoparticles.* *Beilstein Journal of Nanotechnology.* 7, 1330-1337, 2016.
7. **Reynolds D.C., Look D.C., Jogai B., Morkoc H.** *Solid State Comm.* 101, 643, 1997.
8. **Andree B., Bela K., Horvath T., Lux M., Ramm R., Venturini L., Ciubotaru A., Zweigerdt R., Haverich A., Hilfiker A.** *Basic Res. Cardiol.* 109, 441, 2014.
9. **Vukadinovic-Nikolic Z., Andree B., Dorfman S. E., Pflaum M., Horvath T., Lux M., Venturini L., Bar A., Kensah G., Lara A.R., Tudorache I., Cebotari S., Hilfiker-Kleiner D., Haverich A., Hilfiker A.** *Tissue Eng. Part A.* 20, 799–809, 2014.
10. **Chicurel M.E., Chen C.S., Ingber D.E.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10, 232–239, 1998.
11. **Fu P.P., Xia Q., Hwang H.M., Ray P.C., Yu H.** *Journal of Food and Drug Analysis.* 22(1), 64–75, 2014.
12. **Minai L., Yeheskely-Hayon D., Yelin D.** *Scientific Reports.* 3, 2146, 2013.
13. **Souza G. R., Molina J.R., Raphael R.M., Ozawa M.G., Stark D.J., Levin C.S., Bronk L.F., Ananta J.S., Mandelin J., Georgescu M.M., Bankson J.A., Gelovani J.G., Killian T.C., Arap W., Pasqualini R.** *Nature Nanotechnology.* 5, 291–296, 2010.
14. **Dobson J.** *Nature Nanotechnology.* 3, 139–143, 2008.
15. **Riegler J., Liew A., Hynes S.O., Ortega D., O'Brien T., Day R.M., Richards T., Sharif F., Pankhurst Q.A., Lythgoe M.F.** *Biomaterials.* 34(8), 1987–1994, 2008.

Recomandat spre publicare: 12.05.2016.