

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Объект авторского права
УДК 544.77:535.37:576.08

РАДЧЕНКО
Александра Валерьевна

**ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ КОЛЛОИДНЫХ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ
НАНОКРИСТАЛЛОВ ПРОИЗВОДНЫМИ ПОЛИ(МАЛЕИНОВОГО
АНГИДРИДА-АЛЬТ-1-ТЕТРАДЕЦЕНА) ДЛЯ РЕГУЛИРОВАНИЯ ИХ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук
по специальности 02.00.04 – физическая химия

Минск, 2022

Работа выполнена в Белорусском государственном университете и
в Учреждении Белорусского государственного университета
«Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»

Научный руководитель – **Артемьев Михаил Валентинович,**
доктор химических наук, доцент,
заведующий лабораторией нанохимии
Учреждения Белорусского государственного
университета «Научно-исследовательский
институт физико-химических проблем»

Официальные оппоненты: **Косандрович Евгений Генрихович,**
доктор химических наук, доцент
заведующий лабораторией ионного обмена и сорбции
Государственного научного учреждения
«Институт физико-органической химии
Национальной академии наук Беларуси»

Кулакович Ольга Сергеевна,
кандидат химических наук,
ведущий научный сотрудник центра «Нанопотоника»
Государственного научного учреждения
«Институт физики имени Б.И. Степанова
Национальной академии наук Беларуси»

Оппонирующая организация – Государственное научное учреждение
«Институт общей и неорганической химии
Национальной академии наук Беларуси»

Защита состоится «6» декабря в 10.00 на заседании совета по защите
диссертаций Д 02.01.09 при Белорусском государственном университете
по адресу: 220030, г. Минск, ул. Ленинградская, 8 (корпус юридического
факультета), ауд. 407.

Телефон ученого секретаря +375-17-209-53-97, e-mail: blokhin@bsu.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Белорусского
государственного университета.

Автореферат разослан « » ноября 2022 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
доктор химических наук, профессор

А.В. Блохин

ВВЕДЕНИЕ

Вещества в наноразмерном состоянии изучаются и используются в различных научных направлениях: материаловедении, оптике, биотехнологии и др. Под термином «наноматериалы» понимают объекты, имеющие геометрические размеры, или элементы внутренней структуры или поверхности в диапазоне от 1 до 100 нм. При таких размерах частицы становятся соизмеримыми с различными физическими параметрами системы – размер экситона, размер магнитных доменов, длина пробега электрона, что приводит к проявлению в материалах размерных эффектов. Следовательно, контроль размерных параметров даёт возможность создавать новые материалы с уникальными характеристиками. Например, суперпарамагнитные наночастицы на основе Fe_3O_4 используются в медицине для диагностики заболеваний и визуализации органа-мишени методом магнитно-резонансной томографии. Золотые и серебряные наночастицы используются в биоаналитических целях, для усиления сигнала от аналита с помощью спектроскопии поверхностно-усиленного комбинационного рассеяния (SERS).

Важным классом нанообъектов являются полупроводниковые нанокристаллы (НК), размер которых хотя бы в одном из направлений не превышает боровский радиус экситона в соответствующем объемном аналоге. Вследствие пространственного ограничения фотогенерированных электрон-дырочных пар (экситонов), полупроводниковым НК присущи уникальные оптические свойства: большие значения квантового выхода (КВ) фотолуминесценции (ФЛ) и молярного коэффициента поглощения, высокая фотостабильность, широкая полоса поглощения и узкий симметричный пик эмиссии, положение которого зависит от размера и формы НК. Поскольку методы коллоидной препаративной химии позволяют прецизионно контролировать размеры НК в трех направлениях, это даёт возможность получать материалы с заданными оптическими параметрами, что делает НК перспективными материалами для широкого спектра приложений: в тонкопленочных конверторах света для повышения эффективности солнечных батарей, в фотовольтаических и сенсорных устройствах.

Полупроводниковые НК являются перспективным объектом изучения и в области биотехнологии. Поскольку размеры таких частиц сопоставимы с биологическими макромолекулами (2–10 нм), это делает возможным применять их в биологических системах в качестве оптических меток, молекулярных трейсеров, терапевтических агентов с возможностью флуоресцентной визуализации в органах, тканях и клетках. Из-за уникальных оптических свойств НК являются перспективной альтернативой традиционным органическим флуорофорам в биологических и медицинских *in vitro* и *in vivo* исследованиях.

Поскольку монодисперсные НК с заданными оптическими характеристиками получают в основном в результате высокотемпературного коллоидно-химического синтеза в органических растворителях, необходима разработка эффективных

методов солюбилизации получающихся гидрофобных НК. Приоритетным направлением исследований НК для использования в биотехнологии является контроль поверхностных свойств и биохимического поведения водных дисперсий НК, разработка методов химической модификации лигандной или полимерной оболочки и изучение взаимосвязи между свойствами поверхности и физико-химическими характеристиками НК. Актуальность данного направления определяется тем, что поведение НК в биологических системах зависит от ряда параметров, таких как поверхностный заряд и гидродинамический размер НК, а также биологической среды, в которой проводится исследования. Поэтому контроль поверхностных свойств водных дисперсий НК является неотъемлемой частью процесса получения функциональных материалов на их основе для использования в биомедицине.

В настоящей диссертационной работе представлены результаты, полученные в рамках научно-исследовательской работы лаборатории нанохимии Учреждения БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», выполняемой под руководством доктора химических наук М.В. Артемьева и посвящённой разработке методик модификации полимерной оболочки на основе производных поли(малеинового ангидрида-альт-1-тетрадецена) (ПМАТ) инкапсулированных НК, изучению их фундаментальных оптических свойств в водных коллоидных растворах и эффективности их клеточного поглощения для последующего практического использования в качестве флуоресцентных меток и трейсеров в биомедицине.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами. Исследования по тематике данной диссертационной работы проводили в 2016–2022 гг. в лаборатории нанохимии Научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета. Отдельные этапы работы выполнены в рамках следующих государственных программ научных исследований (ГПНИ) и исследовательских проектов:

1) Проект БРФФИ №Х20М-031 «Влияние химической модификации полимерной оболочки гидрофильных люминесцентных квантовых точек на их физико-химические и оптические свойства» (2020–2022 гг., № ГР 20201270, научный руководитель Радченко А.В.).

2) ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограмма «Новые химические технологии и продукты», задание 1.13 «Новые материалы на основе квантоворазмерных нанокристаллов для оптики, оптоэлектроники и биомедицинских приложений» (2016–2018 гг., № ГР 20161367, научный руководитель: Артемьев М.В.).

3) ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограмма «Новые химические технологии и продукты», задание 1.36 «Гибридные функциональные

материалы на основе неорганических нанокристаллов, получаемых методами коллоидной химии» (2019–2020 гг., № ГР 20190702, научный руководитель: Артемьев М.В.)

4) ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия» подпрограмма «Химические технологии, процессы и реагенты», 2021–2025 гг., задание 2.1.04.01 «Оптически активные гибридные системы» (2021–2025 гг., № ГР 20210538, научный руководитель: Артемьев М.В.)

5) Проект БРФФИ № X20КИ-009 от 03.02.2020 г. «Разработка методов визуализации *in vivo* стволовых клеток, меченых люминесцентными квантовыми точками с эмиссией в коротковолновой ИК области», 2020–2021 гг., № ГР 20200255, научный руководитель: Артемьев М.В.).

6) Проект БРФФИ № X18Р-173 «Флуоресцентные нанозонды с одно- и двухфотонным возбуждением на основе конъюгатов полупроводниковых нанопластин с биологическими молекулами для визуализации распределения белков в биологических образцах» (2018–2020 гг., № ГР 20181257, научный руководитель Артемьев М.В.).

7) Договор № 03/183-20 на выполнение научно-исследовательской работы «Разработка методик получения флуоресцентных меток на основе квантовых точек и нанопластин для флуоресцентного анализатора сверхнизких концентраций биологических молекул с двухфотонным лазерным возбуждением», выполняемой в рамках задания 1.13 «Разработать и изготовить флуоресцентный анализатор сверхнизких концентраций биологических молекул с флуоресцентными метками на основе квантовых точек и нанопластин с двухфотонным лазерным возбуждением», подпрограммы «Уникальное научное оборудование» ГНТП «Эталоны и научные приборы», 2021–2023 гг. № ГР 20201798, научный руководитель Артемьев М.В.).

Цель и задачи исследования. *Цель работы* – разработать методы химической модификации полимерной оболочки гидрофильных люминесцентных полупроводниковых НК различными функциональными группами для контроля гидродинамического размера и дзета-потенциала НК в водных коллоидных растворах и установить механизмы влияния поверхностного заряда НК и природы функциональных групп на их физико-химические и биологические свойства коллоидных.

Достижение указанных целей предполагало решение следующих основных задач:

– разработать методики химической модификации различными функциональными производными (органические сульфонаты, сульфаты, фосфонаты, фосфаты, четвертичные аммонийные основания, азиды, краун-эфир, биологически активные молекулы) полимерной оболочки на основе ПМАТ инкапсулированных НК соединений $A^{IV}B^{VI}$ типа «ядро-оболочка»;

– определить влияние природы, заряда и соотношения функциональных групп в полимерной оболочке инкапсулированных квантовых точек (КТ) на их

агрегативную стабильность и оптические свойства;

– предложить физико-химическую модель механизма влияния знака и величины дзета-потенциала коллоидных КТ, и химического состава полимерной оболочки на квантовый выход ФЛ КТ в водных дисперсиях;

– изучить влияние ζ -потенциала и химического состава полимерной оболочки инкапсулированных КТ, а также химического состава инкубационной среды на эффективность клеточного поглощения КТ и флуоресцентного маркирования раковых клеточных культур и механизмы интернализации в клеточное пространство (эндоцитоза);

– разработать методику формирования флуоресцентных меток с двухфотонным возбуждением ФЛ на основе инкапсулированных КТ и квантовых нанопластин (КНП) соединений $A^{II}B^{VI}$ типа «ядро-оболочка» и оценить применимость таких меток в флуоресцентном анализе биологических объектов.

Объекты исследования: водные дисперсии полупроводниковых НК соединений $A^{II}B^{VI}$ типа «ядро-оболочка», находящиеся в различных режимах размерного квантования (0D – CdSe/ZnS и ZnSe/ZnS, 1D – CdS/ZnS, 2D – CdSSe/ZnCdS), инкапсулированных в амфифильную полимерную оболочку на основе химически модифицированного ПМАТ.

Предмет исследования: влияние химического состава полимерной оболочки инкапсулированных полупроводниковых НК на основе соединений $A^{II}B^{IV}$ на их физико-химические, оптические и биологические свойства.

Научная новизна полученных результатов:

Разработаны методики химической модификации полимерной оболочки инкапсулированных коллоидных НК соединений $A^{II}B^{IV}$ посредством химической модификации ПМАТ методом карбодимидного кросс-сочетания с низкомолекулярными аминопроизводными, содержащими различные функциональные группы. Установлено, что, варьируя тип и количественное соотношение заряженных групп в химически модифицированном ПМАТ, можно контролировать дзета-потенциал КТ в водных коллоидных растворах от -40 до $+30$ мВ с различным рН-откликом, чувствительностью к изменению концентрации ионов IА и IIА группы, эффективностью [3+2]-азидалкинового циклоприсоединения с молекулами ДНК и цитотоксичностью.

Разработан метод оценки зависимости между площадью поверхности инкапсулированных НК соединений $A^{II}B^{VI}$ типа «ядро-оболочка» различной морфологии (сферические КТ и квантовые наностержни) и средним числом молекул ПМАТ на их поверхности. Разработана оригинальная методика получения водных коллоидных КТ, инкапсулированных смесью ПМАТ с различной молекулярной массой, где полимерные цепи ПМАТ с большей молекулярной массой определяют поверхностный заряд и агрегативную стабильность КТ, а с меньшей – являются активными центрами для конъюгации с биомолекулами.

Впервые выявлен эффект влияния ζ -потенциала на квантовый выход ФЛ КТ

CdSe/ZnS с различным диаметром ядра CdSe (2.7, 3.0 и 5.6 нм) и толщиной оболочки ZnS (1 и 4 МС). При уменьшении абсолютного значения поверхностного заряда коллоидных КТ интенсивность излучательной рекомбинации фотовозбуждённых экситонов растёт, а безызлучательной – падает, что приводит к общему усилению интенсивности ФЛ.

Установлено влияние ζ -потенциала инкапсулированных КТ CdSe/ZnS на эффективность интернализации и активируемые пути эндоцитоза в раковых клеточных культурах (глиома С6, *Hela*, U937 и асцитная карцинома Эрлиха) в различных инкубационных средах (среда DMEM, фосфатный буфер, различные концентрации ионов Ca^{2+}). Показано, что для цвиттер-ионных КТ с ζ -потенциалом близким к нулю эффективность клеточного маркирования минимальна, так как неспецифические электростатические взаимодействия с клеточными мембранами сведены к минимуму. В зависимости от их поверхностного заряда, коллоидные КТ в разной степени проникают в клетку за счёт различных путей эндоцитоза (механизмы, зависящие от клатрина и липидных рафтов-кавеол, динамина и т.д.) или агрегируют на клеточной мембране. Природа функциональных групп не влияет на биологическое поведение цвиттер-ионных КТ при условии близких значений ζ -потенциала ($\zeta = 4\text{--}5$ мВ), и они одинаковым образом взаимодействуют с фагоцитирующими и нефагоцитирующими клетками.

Впервые экспериментально продемонстрирована возможность использования водных коллоидных КТ и КНП CdSe, с цвиттер-ионной полимерной оболочкой и регулируемым дзета-потенциалом в качестве клеточных флуоресцентных маркеров с двухфотонным возбуждением ФЛ. Показано, что КНП также эффективно проникают через клеточные мембраны клеток глиомы С6 и скапливаются внутри, как и значительно меньшие по размеру КТ. Высокая эффективность двухфотонного возбуждения ФЛ КНП позволяет обнаруживать и визуализировать их в клетках в концентрациях на два порядка меньших по сравнению с КТ.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1) Оригинальные методики химической модификации ПМАТ и инкапсуляции гидрофобных люминесцентных НК соединений $\text{A}^{\text{IV}}\text{B}^{\text{VI}}$ типа «ядро-оболочка», находящихся в различных режимах размерного квантования, а также взаимосвязь между химическим составом полимерной оболочки и физико-химическими характеристиками (ζ -потенциал и гидродинамический диаметр) НК в водных дисперсиях. Экспериментальная демонстрация влияния электростатического фактора на эффективность конъюгации водных дисперсий НК с различным поверхностным зарядом с молекулами ДНК. Концепция формирования конъюгатов биологически активных молекул и КТ на основе координационных соединений ионов металлов, способных к направленному разделению внутри клеток.

2) Экспериментально установленная взаимосвязь площади поверхности НК соединений $\text{A}^{\text{IV}}\text{B}^{\text{VI}}$ и концентрации ПМАТ на их поверхности после процедуры инкапсуляции для количественной оценки содержания полимера и активных

функциональных групп.

3) Экспериментально установленная зависимость квантового выхода ФЛ КТ CdSe/ZnS, инкапсулированных в производные ПМАТ, от их ζ -потенциала в водных дисперсиях. Предложенный механизм тушения ФЛ сильнозаряженных КТ на основе изменения в относительных скоростях излучательной и безызлучательной рекомбинации при изменении поверхностного заряда солубилизованных НК.

4) Зависимость эффективности флуоресцентного окрашивания и активации механизмов эндоцитоза в ряде раковых клеточных культур в инкубационных средах различного состава от ζ -потенциала и функционализации амфифильной полимерной оболочки инкапсулированных КТ CdSe/ZnS.

5) Новый тип флуоресцентных меток с двухфотонным возбуждением ФЛ на основе КТ и КНП соединений $A^{IV}B^{VI}$, инкапсулированных в цвиттер-ионную оболочку производного ПМАТ.

Личный вклад соискателя заключается в разработке методик химической модификации полимерной оболочки гидрофильных полупроводниковых НК, исследовании их физико-химических и оптических свойств, эффективности конъюгации с биомолекулами и клеточного маркирования. Постановка задач и целей диссертационного исследования, а также подготовка материалов для научных публикаций осуществлялась совместно с научным руководителем доктором химических наук М. В. Артемьевым. Ряд исследований проводили совместно с сотрудниками НИИ ФХП БГУ: К. В. Скорцкой (электронная микроскопия) и Д. И. Шиманом (ЯМР-спектроскопия, термогравиметрический анализ, синтез ПМАТ различной молекулярной массы). Исследования методом инфракрасной спектроскопии выполнялись совместно с А. С. Мацукович и А. Г. Карозой (группа академика, профессора, д. ф.-м. н. С. В. Гапоненко, Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси). Работы по изучению конъюгации квантовых точек с ДНК проводились совместно с группой В. В. Шманая (Институт физико-органической химии НАН Беларуси). Исследования в области мечения раковых клеток, проточная цитофлуометрия и флуоресцентная микроскопия проводились совместно с Т. И. Терпинской (группа к. б. н. Ю. А. Рудниченко, Институт физиологии НАН Беларуси). Исследования в области использования КНП и КТ в качестве двухфотонных флуоресцентных меток проводились совместно с группами д. х. н. В. Олейникова (Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина) и Ю. А. Овчинникова (РАН, Москва). Анализ результатов оптических измерений проводился с А. Ахштайном (группа профессора У. Воггон, Технический университет г. Берлин).

Апробация результатов диссертации. Результаты исследований были представлены на республиканских и международных конференциях: Молодёжь в науке (Минск, 2017, 2018), Сахаровские чтения 2021 года: экологические проблемы XXI века (Минск, 2021), Современные проблемы клеточной инженерии, иммунологии и аллергологии (Минск, 2021), Физико-химическая биология как

основа современной медицины (Минск, 2021), International Conference for Students of Physics and Natural Sciences Open Readings (Vilnius, Lithuania, 2017, 2019–2021), Ломоносов–2021 (Москва, Россия), Saint Petersburg OPEN 2021 (St Petersburg, Russia, 2021).

Опубликованность результатов диссертации. По результатам исследований данной диссертационной работы опубликовано 24 научные работы, в том числе 9 статей в научных рецензируемых изданиях, соответствующих п. 19 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий» (6,5 авт. л.); 5 статей в сборниках материалов научной конференции; 10 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, пяти глав, заключения, библиографического списка и приложения. Работа изложена на 125 страницах, в том числе 16 таблиц, 48 рисунков, 1 приложение на 38 страницах. Список использованных источников содержит 198 наименований на 17 страницах, включая 24 публикации соискателя на 4 страницах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **первой главе** обобщены и проанализированы литературные данные об уникальных оптических свойствах люминесцентных полупроводниковых НК и преимуществах их использования в качестве аналогов органических флуоресцентных меток в биомедицине. В этой же главе рассмотрены методы гидрофилизации поверхности гидрофобных НК, получаемых методами высокотемпературного металлоорганического синтеза, а также влияния физико-химических характеристик водных коллоидных НК на эффективность маркирования ими различных клеточных культур.

Более детально рассмотрены методы сольубилизации гидрофобных НК. В частности, посредством лигандного обмена и инкапсуляции во вторичную амфифильную полимерную оболочку. Метод инкапсуляции в амфифильную полимерную оболочку является более перспективным, поскольку обеспечивает долговременную коллоидную и термическую стабильность водных дисперсий НК, даёт широкий спектр возможностей контроля их дзета-потенциала и гидродинамического размера, а также взаимодействия с клетками за счет конъюгации с биомолекулами или другими низкомолекулярными органическими молекулами посредством стандартных методик карбодимидного, изотиоционатного или клик-кросс-сочетания.

В конце главы показано, что гидродинамический диаметр, ζ -потенциал и природа органической оболочки НК влияют на механизмы (клатрин- и рафт-зависимый и кавеоллярный эндоцитоз), эффективность и скорость клеточного поглощения НК.

Во **второй главе** описаны методы синтеза гидрофобных люминесцентных НК соединений $A^{IV}B^{VI}$ типа «ядро-оболочка» и их анализа с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и оптической спектроскопии.

Описаны методики химической модификации (ПМАТ) посредством карбодимидного кросс-сочетания с различными органическими молекулами. Степень конвертации карбоксильных групп ПМАТ контролировалась методами ^1H -ЯМР и ИК-спектроскопии. Описана процедура инкапсуляции гидрофобных НК химически модифицированным ПМАТ, после чего физико-химические и оптические характеристики водных коллоидных растворов НК анализировались методами динамического рассеяния света и оптической спектроскопии. Меченые НК клеточные культуры исследовались методами проточной цитофлуометрии и флуоресцентной микроскопии.

Третья глава посвящена разработке метода количественного определения концентрации молекул ПМАТ на поверхности инкапсулированных НК в водных дисперсиях и методикам контролируемого варьирования их ζ -потенциала и гидродинамического диаметра посредством химической модификации ПМАТ бифункциональными органическими молекулами. Для определения концентрации полимерных цепей в органической оболочке НК использовался ПМАТ, химически модифицированный красителем 4-(флуоресцеин-6-карбоксамид)бутиламмоний хлоридом (ФАМ). На рисунке 1 приведены схемы реакции конъюгации ПМАТ с ФАМ и структура поверхности инкапсулированных НК.

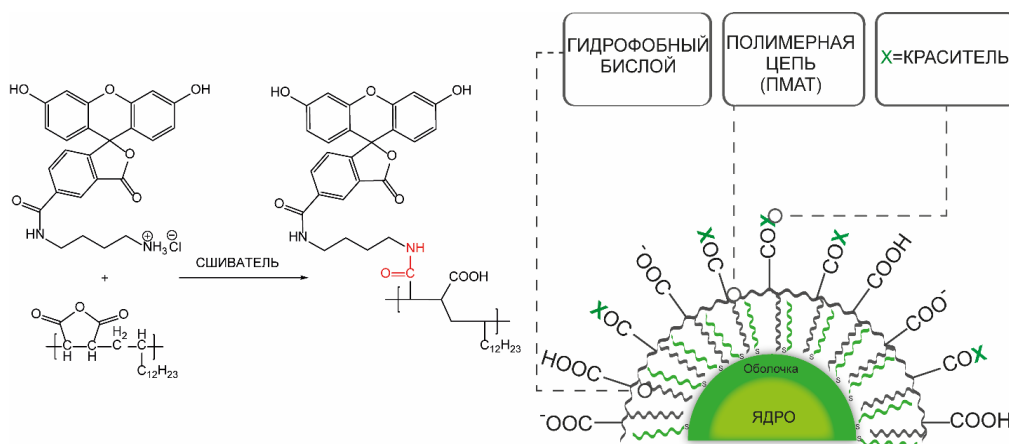


Рисунок 1 – Схема реакции кросс-сочетания между ПМАТ и ФАМ и структуры полимерной оболочки, инкапсулированной НК-ФАМ

Используя разностный спектр поглощения НК-ФАМ и НК, и литературные данные по молярным коэффициентам оптического поглощения НК и ФАМ определялось среднее число молекул ПМАТ на поверхности инкапсулированных НК различного размера и морфологии. Оказалось, что для НК с различной кристаллической структурой (вюрцит или сфалерит), размером и формой (квазисферические КТ и наностержни (НС)), среднее число молекул ПМАТ, приходящихся на один НК, демонстрирует линейную зависимость от его площади при значениях диаметра КТ более 4 нм (рисунок 2). Для КТ меньших размеров наблюдается отклонение зависимости от линейности за счет конкуренции между алкильными цепями полимера за поверхностные тиольные сайты связывания.

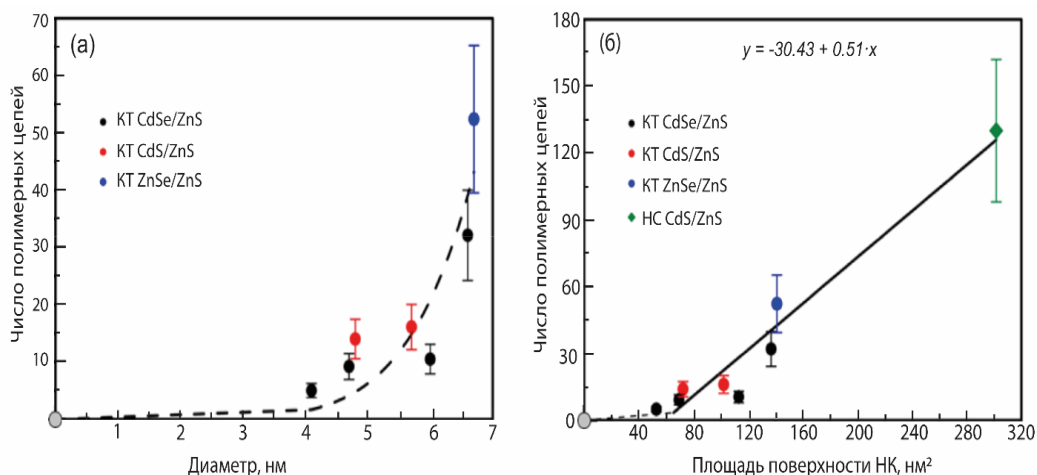


Рисунок 2 – Среднее количество полимерных цепей ПМАТ, приходящихся на один НК в зависимости от (а) диаметра КТ и (б) площади поверхности КТ и НС. Сплошная кривая на рисунке (б) является линейной аппроксимацией уравнения $y = -30.43 + 0.51 \cdot x$

Поскольку КТ, инкапсулированные в немодифицированный ПМАТ, непригодны для использования в биомедицине из-за потери зарядовой агрегативной стабильности при $pH \leq 7$ в результате протонирования карбоксильных групп, разработана методика получения КТ с варьируемым ζ -потенциалом от -40 до $+30$ мВ посредством химической модификации ПМАТ различными бифункциональными аминокислотными низкомолекулярными соединениями: таурин, (2-аминоэтил)фосфоновая кислота, (2-аминоэтил)сульфат, (2-аминоэтил)фосфат, (2-аминоэтил)триэтиламмоний хлорид. На рисунке 3 представлены зависимости ζ -потенциала и гидродинамического диаметра водных коллоидных КТ, несущих различные заряженные группы в полимерной оболочке.

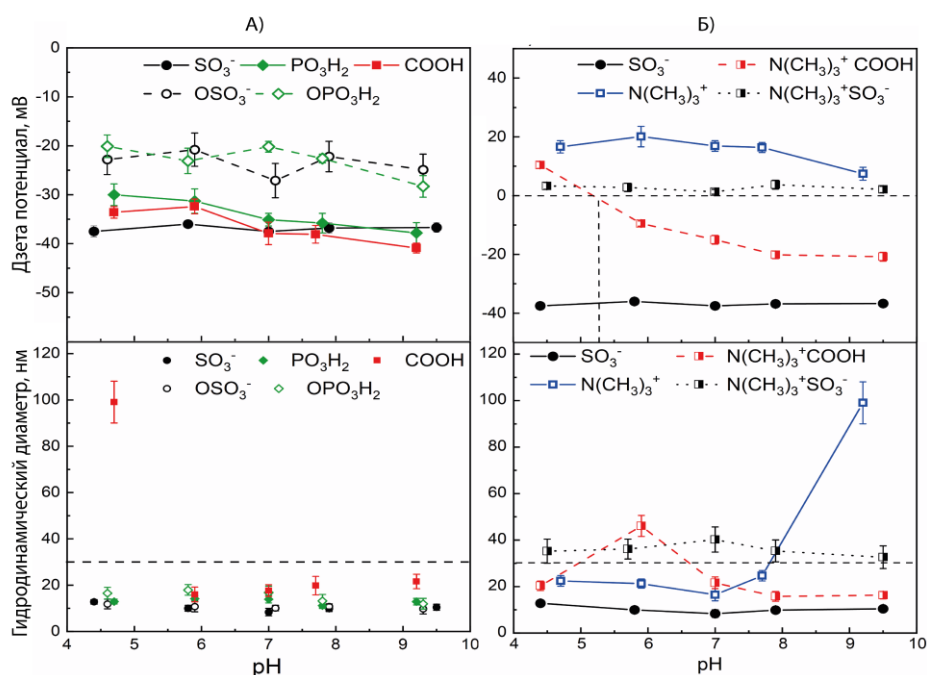


Рисунок 3 – Зависимость дзета-потенциала (сверху) и гидродинамического диаметра (снизу) для КТ с различными заряженными группами в полимерной оболочке

Изменения значений ζ -потенциала КТ, инкапсулированных модифицированным ПМАТ коррелируют со значениями pK_a соответствующих низкомолекулярных аналогов. Так, для сильных кислот ($-\text{SO}_3^-$, $-\text{OSO}_3^-$) и оснований ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$) наблюдалось рН-независимое значения дзета-потенциалов, а для слабых электролитов ($-\text{COOH}$, $-\text{OPO}_3\text{H}_2$, $-\text{PO}_3\text{H}_2$) абсолютное значение поверхностного заряда росло при увеличении рН. При модификации $\sim 50\%$ карбоксильных групп исходного ПМАТ четвертичными аммонийными остатками образовывались цвиттер-ионные КТ с рН-варьируемым дзета-потенциалом, имеющие изоэлектрическую точку 5.5. При использовании для химической модификации ПМАТ смеси таурина и (2-аминоэтил)триэтиламмоний хлорида в соотношении $\sim 1:1$ образовывались коллоидностабильные КТ с близким к нулю дзета-потенциалом в диапазоне рН от 4,9 до 9,5.

Показано, что при введении дополнительных азидных групп в оболочку ПМАТ инкапсулированные водные коллоидные КТ способны к конъюгации с олигонуклеотидами посредством [3+2]-азидалкинового циклоприсоединения. Цвиттер-ионные КТ, содержащие в оболочке четвертичные аммонийные и карбоксильные группы с малым отрицательным значением ζ -потенциала порядка -3 мВ наиболее эффективно вступают в реакцию кросс-сочетания, что указывает на значительное влияние фактора электростатического отталкивания между одноименно заряженными КТ и олигонуклеотидами. При использовании аналогичной цвиттер-ионной полимерной оболочки с производными 18-краун-6 и 15-краун-5 дзета-потенциал КТ может варьироваться -10 мВ до $+20$ мВ посредством изменения концентрации ионов Na^+ или K^+ в водном коллоидном растворе.

Разработана оригинальная методика инкапсуляции КТ смесью двух производных ПМАТ с различной степенью полимеризации, где длинноцепочечный полимер формирует цвиттер-ионную оболочку и обеспечивает агрегативную стабильность и необходимый ζ -потенциал, а короткоцепочечный полимер служит для биоконъюгации через мостиковые карбоксильные группы с производным бетулиновой кислоты в качестве противоракового агента для его адресной доставки в клетки с флуоресцентной визуализацией.

В четвертой главе рассмотрено влияние поверхностного заряда инкапсулированных КТ типа «ядро-оболочка» CdSe/ZnS с различными размерами ядра, толщиной эпитаксиальной оболочки и химическим составом полимера на их ФЛ характеристики в водных дисперсиях.

Впервые обнаружено, что для инкапсулированных КТ CdSe/ZnS с различными заряженными функциональными группами в полимерной оболочке, уменьшение по абсолютному значению ζ -потенциала водных коллоидных КТ приводит к существенному росту КВ ФЛ, величина которого стремится к максимальному значению при $\xi \approx 0$ (рисунок 4 а), причем тип функциональных

групп в полимерной оболочке КТ практически не имеет значения. Также при увеличении дзета-потенциала КТ за счёт изменения типа функциональных групп и их количества в ПМАТ наблюдалось коротковолновое смещение максимума полосы ФЛ КТ на 7 нм, что соответствует увеличению ширины запрещённой зоны КТ на 30 мэВ.

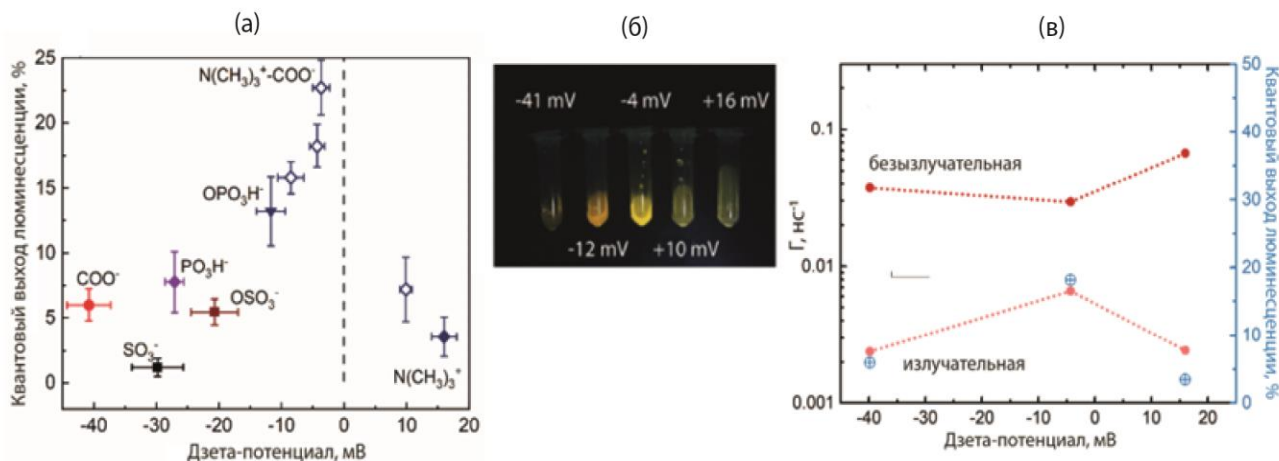


Рисунок 4 – а) Зависимость квантового выхода ФЛ от дзета-потенциала для водных коллоидных КТ с полимерной оболочкой различного состава б) Флуоресцентное изображение водных коллоидных растворов КТ одинаковой концентрации с различным дзета потенциалом. в) Левая ось: зависимость скоростей излучательной и безызлучательной рекомбинации в фотовозбужденных КТ от ζ -потенциала. Правая ось: зависимость КВ ФЛ от ζ -потенциала КТ

Для описания механизма тушения ФЛ были исследованы времена затухания ФЛ для КТ с тремя значениями $\xi = -39$ мВ, -4 мВ и $+16$ мВ. Для кривых затухания ФЛ были рассчитаны их параметры (таблица 1), а по уравнениям 1–3 – скорости излучательной и безызлучательной рекомбинации.

Таблица 1 – Параметры кривых времен затухания ФЛ и соответствующих квантовых выходов ФЛ КТ с различным значением ζ

ζ -потенциал, мВ	КВ ФЛ, %	τ_1 , нс	A_1	τ_2 , нс	A_2	$\langle \tau \rangle$, нс
-39	6,0	7,6	0,51	29,8	0,49	25
-4	18,2	10,8	0,46	32,5	0,54	28
+16	3,5	4,3	0,55	17,5	0,45	14

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_{i=1}^2 A_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^2 A_i \tau_i} \quad (1)$$

$$\tau_{\text{ср изл}} = \frac{\langle \tau \rangle}{\text{КВ ФЛ}} \quad (2)$$

$$\tau_{\text{ср безызл}} = \frac{\langle \tau \rangle}{1 - \text{КВ ФЛ}} \quad (3)$$

где A_i – вклады i -го компонента полученные из биэкспоненциальной аппроксимации данных кривых времен затухания, τ_i – среднее время жизни i -го компонента, нс.

Показано, что скорость излучательной рекомбинации падает при увеличении абсолютного значения ζ -потенциала за счёт кулоновского экранирования, которое влияет на эффективность перекрытия волновых функций электрона и дырки экситона и их энергию связывания, что приводит к изменению значения дипольного момента оптического перехода и плотности электронных состояний в КТ (рисунок 4 в). В свою очередь, скорость безызлучательной рекомбинации увеличивается при увеличении поверхностного заряда КТ. Данный эффект тушения ФЛ за счёт безызлучательных процессов определяется соотношением площади к объёму частицы ($3/r$) и толщиной оболочки ZnS. Так, КТ с более толстой оболочкой (рисунок 5 А) и с большим диаметром ядра (рисунок 5 Б) имеют более высокое значение КВ ФЛ при $\zeta \approx 0$ мВ.

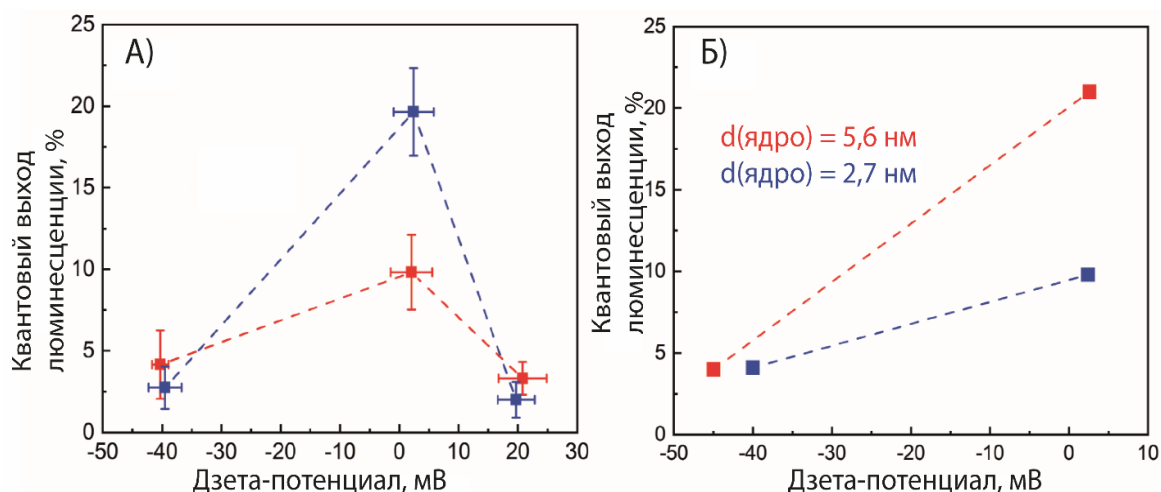


Рисунок 5 – А) Зависимость КВ ФЛ от ζ -потенциала для КТ с одинаковым диаметром ядра ($d = 2.7$ нм) и различной толщиной оболочки ZnS: 1 МС (красная линия) и 4 МС (синяя линия). Б) Зависимость КВ ФЛ от ζ -потенциала для КТ с разным размером ядра ($d = 2.7$ и 5.6 нм) и одинаковой толщиной оболочкой 1 МС ZnS

Пятая глава посвящена изучению влияния дзета-потенциала КТ $A^{IV}B^{VI}$ типа «ядро-оболочка» CdSe/ZnS на эффективность маркирования раковых клеточных культур и механизмов активации различных типов эндоцитоза. Показано, что для цвиттер-ионных КТ, содержащих карбоксильные и четвертичные аммонийные остатки в полимерной оболочке, наблюдается рН-зависимая эффективность эндоцитоза, причем при приближении значения рН к нейтральному и величины дзета-потенциала к нулю эффективность клеточного поглощения падает. Поверхностный заряд КТ существенно влияет на механизмы эндоцитоза, а ионы кальция могут как активировать различные пути эндоцитоза, так и не оказывать существенного влияния на степень поглощения КТ в клеточное пространство (рисунок б).

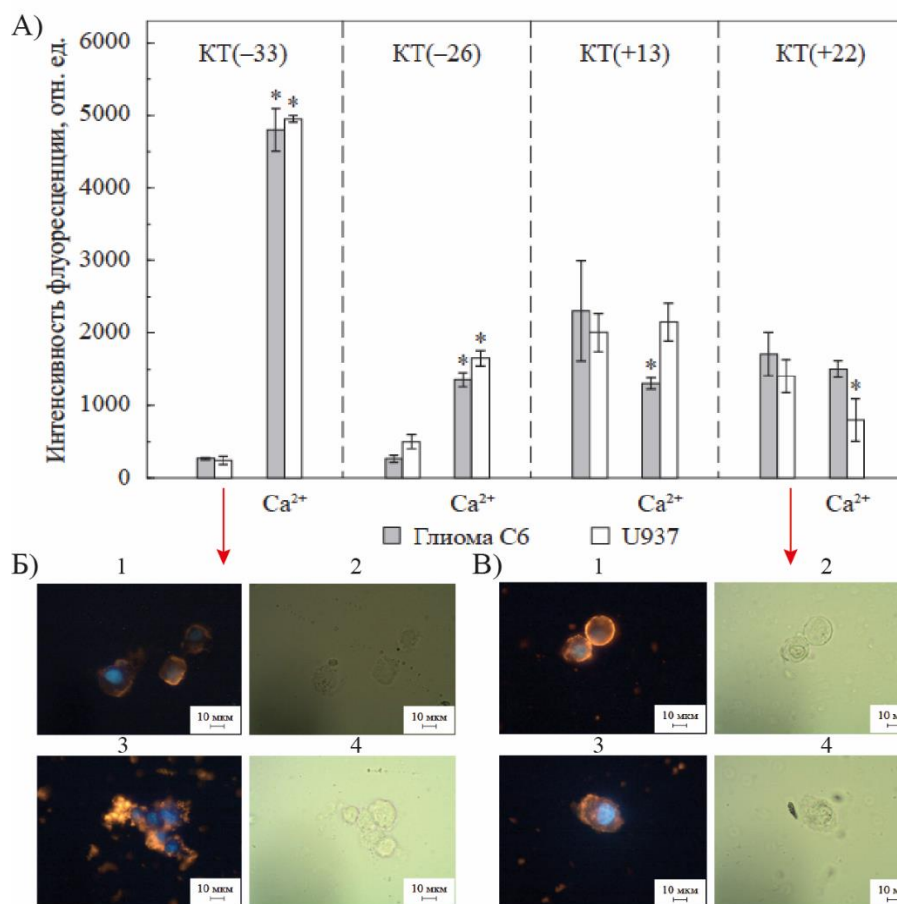


Рисунок 6 – А) Результаты проточной цитофлуориметрии клеток глиомы С6 и U937, маркированных КТ с различным ζ -потенциалом (интенсивность флуоресценции нормирована на данные по КВ ФЛ из таблицы 5.2).

Б), В) Флуоресцентные (слева) и светлополевые (справа) изображения клеток U937, окрашенных КТ(- 33 мВ) (б) и КТ(+ 22 мВ) (в) в среде без CaCl₂ (1,2) и с CaCl₂ (3,4). Ядра клеток окрашены красителем Hoechst 33342

Клеточное поглощение сильноотрицательных КТ с $\zeta = -33$ мВ зависит от клатрина и липидных рафтов-кавеол, а ионы кальция терминируют все исследованные механизмы, при этом наблюдается агрегация КТ в области клеточной мембраны (рисунок 5 Б, панель 3). Напротив, цвиттер-ионные КТ с $\zeta = +13$ мВ в бескальциевой среде поглощаются клетками за счёт динамина, а ионы кальция индуцируют все исследованные механизмы эндоцитоза.

На примере двух типов цвиттер-ионных полимерных оболочек с четвертичными аммонийными и карбоксильными/сульфонатными группами показано, что тип функциональных групп не влияет на биологическое поведение КТ: они одинаковым образом взаимодействуют с клетками фагоцитирующего (глиомы С6 и *Hela*) и нефагоцитирующего (U-937) ряда.

Впервые продемонстрирована принципиальная возможность использования КТ и КНП соединений А^{IV}В^{VI} типа «ядро-оболочка» в качестве флуоресцентных клеточных маркеров с двухфотонным возбуждением ФЛ импульсным ИК-лазером. Для анализа эффективности мечения клеток глиомы С6 КНП CdSSe/ZnCdS по

сравнению с КТ CdSe/ZnS использовалась пара образцов, в которых диаметр КТ и толщина КНП подбирались таким образом, чтобы полосы ФЛ спектрально перекрывались с оптическим окном детектора проточного цитофлуориметра при $\lambda = 566\text{--}606$ нм. КТ и КНП имели близкие значения дзета-потенциала ($\xi = +6$ и $+3$ мВ соответственно) и КВ ФЛ (5% и 6% соответственно), что позволяло оценивать эффективность клеточного окрашивания по данным проточной цитофлуориметрии (рисунок 7 А). Также для получения сопоставимых значений сигнала ФЛ в проточном цитофлуориметре от клеток, меченных КТ или КНП, использовался в 100 раз более разбавленная дисперсия КНП, поскольку коэффициент экстинкции КНП приблизительно на два порядка выше, чем у КТ.

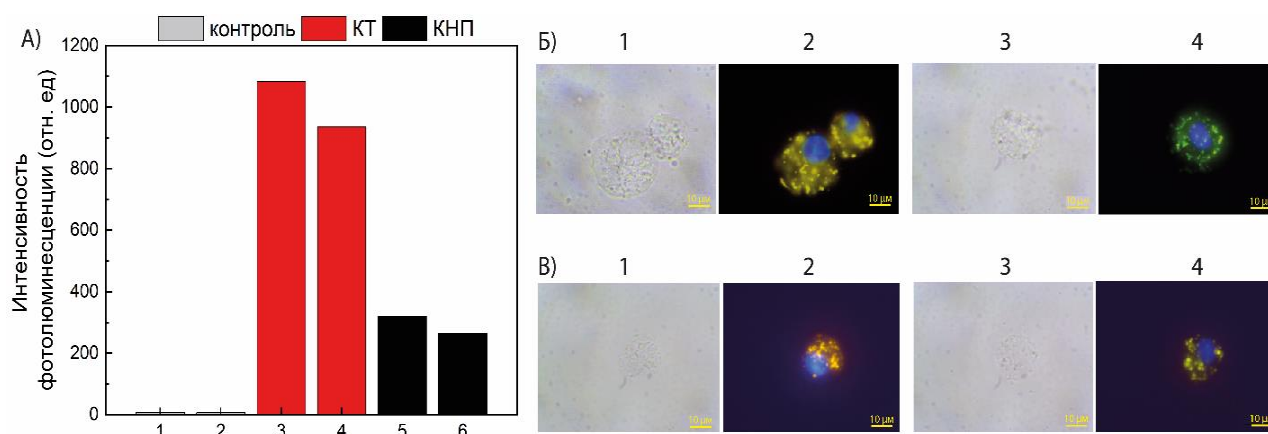


Рисунок 7 – А) Данные проточной цитометрии для клеток глиомы С6, инкубированных в течение 20 часов с КТ (3, 4) и КНП (5, 6) с (4, 6) и без (3, 5) обработки трипановым синим; контрольные образцы без (1) и с (2) с трипановым синим.

Б), В) Светло-полевые и флуоресцентные снимки клеток глиомы С6, меченных КТ (Б) и КНП (В) с (3, 4) и без (1, 2) обработки трипановым синим. Ядра дополнительно окрашивали красителем Hoechst 33342

Из рисунка 7 А видно, что в присутствии трипанового синего, который тушит внеклеточную ФЛ относительный сигнал ФЛ клеток глиомы С6, маркированных КТ и КНП, уменьшается на 14 и 17% и, следовательно, большая часть НК локализована внутри клеток. Флуоресцентные микроскопические изображения клеток глиомы С6, меченных КТ и КНП, показывают, что эффективность клеточного поглощения КНП и КТ сопоставима, несмотря на различный физический размер НК: неорганическое ядро КТ имеет диаметр 3.5 нм, тогда как латеральный размер КНП существенно больше. Более высокая эффективность двухфотонного возбуждения ФЛ КНП позволяет обнаруживать и визуализировать их при более низкой концентрации внутри клеток по сравнению с аналогичными КТ. Практическое использование такого типа флуоресцентных меток с двухфотонным возбуждением позволяет предотвращать оптическое и термическое повреждение биологических объектов за счет использования фемтосекундного импульсного возбуждения и снижает порог обнаружения до единичного НК за счет уменьшения фонового сигнала автофлуоресценции от биологических молекул и тканей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты

1) Разработана оригинальная методика инкапсуляции люминесцентных НЧ соединений $A^{II}B^{VI}$ различной морфологии (КТ – CdSe/ZnS и ZnSe/ZnS и НС – CdS/ZnS) амфифильным полимером ПМАТ, а также метод определения количества полимерных цепей ПМАТ на поверхности инкапсулированных НЧ в водных коллоидных растворах. Зависимость концентрации цепей ПМАТ от площади поверхности линейна для КТ, имеющих диаметр более 4 нм. Для КТ меньших размеров наблюдается отклонение зависимости от линейности за счет конкуренции между алкильными цепями полимера за поверхностные тиольные сайты связывания [1, 15].

2) Разработана методика получения инкапсулированных коллоидностабильных КТ CdSe/ZnS типа «ядро-оболочка» с дзета-потенциалом, контролируемым в широком диапазоне от -40 до $+30$ мВ с помощью карбодиимидного кросс-сочетания между ПМАТ и низкомолекулярными соединениями с различными заряженными функциональными группами, а также биологической и химической активностью. Цвиттер-ионная полимерная оболочка, содержащая пространственно-разделенные четвертичные аммонийные основания и карбоксильные группы позволяет получать КТ с рН-варьируемым ζ -потенциалом, а оболочка с четвертичными аммонийными и сульфатными группами дает рН-независимые коллоидностабильные КТ с ζ -потенциалом близким к нулю. Введение дополнительных азидных групп в полимерную оболочку КТ дает возможность их последующей конъюгации с олигонуклеотидами посредством [3+2]-азидалкинового циклоприсоединения, промотируемого напряжением цикла, причём цвиттер-ионные КТ с четвертичными аммонийными и карбоксильными группами с минимальным значением $\zeta = -3$ мВ наиболее эффективно вступают в реакцию кросс-сочетания, что указывает на принципиальную важность фактора минимального электростатического отталкивания между КТ и олигонуклеотидами. При введении остатков краун-эфиров ζ -потенциал цвиттер-ионных коллоидных КТ становится зависимым от изменения концентрации ионов Na^+ или K^+ в водных средах. Для контроля эффективности конъюгации инкапсулированных цвиттер-ионных КТ с биологически активными соединениями, в частности бетулиновой кислотой, разработана оригинальная методика инкапсуляции смесью двух типов производных ПМАТ с различной молекулярной массой, где длинноцепочечный полимер формирует цвиттер-ионную оболочку и обеспечивает коллоидную стабильность и требуемый ζ -потенциал, а короткоцепочечный полимер служит для биоконъюгации через мостиковые карбоксильные группы. [3, 4, 6, 8, 10–13, 16, 18, 19, 21, 24]

3) Впервые обнаружен эффект влияния ζ -потенциала на положение полосы эмиссии и КВ ФЛ инкапсулированных КТ типа «ядро-оболочка» CdSe/ZnS с диаметром ядра 2,7 – 5,6 нм и толщиной оболочки 1 и 4 МС в водной среде.

Показано, что в КТ с цвиттер-ионной полимерной оболочкой и близким к нулевому ζ -потенциалом наблюдается наиболее эффективная излучательная рекомбинация экситонов. Эффективность излучательной рекомбинации падает при увеличении абсолютного значения ζ -потенциала за счёт кулоновского экранирования, которое уменьшает эффективность перекрытия волновых функций электрона и дырки экситона и изменяет их энергию связывания, что влияет на значение дипольного момента оптического перехода и плотности электронных состояний в КТ. Эффект тушения за счёт безизлучательных процессов зависит от соотношения площади ядра КТ к объёму и толщины оболочки ZnS: КТ с диаметром ядра 5,6 нм и толщиной оболочки 4 МС демонстрируют максимальное значение КВ ФЛ при $\zeta \approx 0$ мВ. [9, 20].

4) Установлено существенное влияние ζ -потенциала КТ на эффективность клеточного маркирования и активных механизмов эндоцитоза в 4 линиях раковых клеток – глиомы С6, *HeLa*, U-937 и АКЭ. Показано, что рН-зависимый эндоцитоз наблюдается для КТ с цвиттер-ионной оболочкой, содержащей карбоксильные и четвертичные аммонийные группы. Присутствие ионов кальция в среде инкубирования оказывает значительное влияние на физико-химические и оптические характеристики инкапсулированных КТ, а также механизмы эндоцитоза и степень проникновения КТ в клеточное пространство или агрегацию на клеточных мембранах. На примере двух типов цвиттер-ионных полимерных оболочек с четвертичными аммонийными и карбоксильными/сульфонатными группами показано, что тип функциональных групп не влияет на биологическое поведение КТ: они одинаковым образом взаимодействуют с фагоцитирующими и нефагоцитирующими клетками [2, 5, 14, 16, 22, 23].

5) Разработана методика получения нового типа флуоресцентных маркеров с двухфотонным возбуждением ФЛ на основе инкапсулированных КТ и КНП соединений $A^{IV}B^{VI}$ с цвиттер-ионной оболочкой и слабopоложительным ζ -потенциалом $\zeta = +3$ мВ. Показано, что КНП, также как и КТ, эффективно маркируют клетки глиомы С6 и не агрегируют на клеточных мембранах, несмотря на значительно больший латеральный размер КТ. Флуоресцентная визуализация клеток с помощью КНП возможна при концентрации на 2 порядка меньших по сравнению с КТ из-за значительно более высокой эффективности двухфотонного возбуждения ФЛ [7, 17, 19].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Методики формирования люминесцентных НК, инкапсулированных производными полималеинового ангидрида, содержащими различные функциональные группы, обеспечивающие контроль ζ -потенциала НК в водных дисперсиях, и их способность к конъюгации с биомолекулами могут применяться для получения высокоэффективных флуоресцентных меток для визуализации и флуоресцентного иммуноанализа биологических объектов.

Методика получения нового типа флуоресцентных маркеров с двухфотонным возбуждением ФЛ на основе инкапсулированных КТ и КНП соединений $A^{IV}B^{VI}$ легла

в основу выполнения договора № 03/183-20 «Разработка методик получения флуоресцентных меток на основе квантовых точек и нанопластин для флуоресцентного анализатора сверхнизких концентраций биологических молекул с двухфотонным лазерным возбуждением», выполняемой в рамках задания 1.13 «Разработать и изготовить флуоресцентный анализатор сверхнизких концентраций биологических молекул с флуоресцентными метками на основе квантовых точек и нанопластин с двухфотонным лазерным возбуждением», подпрограммы «Уникальное научное оборудование» ГНТП «Эталоны и научные приборы», 2021–2023 г.г. № ГР 20201798.

Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре биотехнологии Полесского государственного университета по дисциплине «Биологически активные вещества» и на кафедре общей химии Белорусского государственного медицинского университета по предмету «Физическая и коллоидная химия» (подтверждено актами о практическом использовании результатов исследования в образовательном процессе).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, соответствующих пункту 19 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий»

1. Fedosyuk A., Radchanka A., Antanovich A., Prudnikau A., Kvach M.V., Shmanai V., Artemyev M. Determination of concentration of amphiphilic polymer molecules on the surface of encapsulated semiconductor nanocrystals // Langmuir. – 2016. – Vol. 32, Is. 8. – P. 1955–1961.

2. Petrova E. A., Terpinskaya T. I., Fedosyuk A. A., Radchanka A. V., Antanovich A. V., Prudnikau A. V., Artemyev M. V. Luminescent quantum dots encapsulated by zwitterionic amphiphilic polymer: surface charge-dependent interaction with cancer cells // J. Belarus. State Univ. Chem. – 2018. – № 1. – P. 3–13.

3. Radchanka A., Artemyev M. Water-Soluble Cadmium Selenide Quantum Dots with Controlled Surface Charge // International Journal of Nanoscience. – 2019. – Vol. 18. – P. 1940051–1940053.

4. Ranishenka B. A., Ulashchik E. A., Kruhlik A. S. Tatulchenkov M. Yu., Radchanka A. V., Shmanai V. V., Artemyev M. V. Controlled Functionalization of Water-Soluble Semiconductor Quantum Dots for Bioconjugation // Journal of Applied Spectroscopy. – 2020. – Vol. 86, Is. 6. – P. 1064–1070.

5. Радченко А. В., Терпинская Т. И., Янченко Т. Л., Балашевич Т. В., Артемьев М. В. Влияние ионов кальция на физико-химические свойства полупроводниковых квантовых точек, инкапсулированных амфифильным полимером, и эффективность их поглощения клетками // Журнал белорус. гос. ун-та. Химия. – 2020. – № 2. – С. 3–16.

6. Ranishenka B., Ulashchik E., Radchanka A., Shmanai V., Artemyev M.

Electrostatic Repulsion Controls Efficiency of Cu-free Click-Reaction with Azide-Modified Semiconductor Quantum Dots // ChemNanoMat. – Vol. 6, Is. 2. – P. 292–297.

7. Radchanka A., Iodchik A., Terpinskaya T., Balashevich T., Yanchanka T., Palukoshka A., Sizova S., Oleinikov V., Feofanov A., Artemyev M. Emitters with different dimensionality: 2D cadmium chalcogenide nanoplatelets and 0D quantum dots in non-specific cell labeling and two-photon imaging // Nanotechnology. – 2020. – Vol. 31, Is. 43. – P. 435102–435107.

8. Radchanka A., Hrybouskaya V., Antanovich A., Artemyev M. Poly(maleic anhydride) shell modified with negatively and positively charged groups to control zeta potential and hydrodynamic size of encapsulated quantum dots at variable pH // ChemNanoMat. – 2022. – Vol. 8., Is. 4. – P. e202100538–202100545.

9. Radchanka A., Hrybouskaya V., Iodchik A., Achshtein A.W., Artemyev M. Zeta Potential-Based Control of CdSe/ZnS Quantum Dot Photoluminescence // J. Phys. Chem. Lett. – 2022. – Vol. 13. – P. 4912–4917.

Статьи в сборниках материалов научных конференций

10. Ранішэнка Б. В., Радчанка А. В. Азід-сульфатная функцыяналізацыя паверхні водарастваральных паўправадніковых квантавых кропках // Молодежь в науке – 2017: материалы междунар. конф. молодых ученых, Беларусь, Минск, 30 окт. – 2 нояб. 2017 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Совет молодых ученых; редкол.: В. Г. Гусаков [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2018. – Ч. 2. – С. 392–397.

11. Терпинская Т. И., Янченко Т. Л., Радченко А. В., Грибовская В. А., Полукошко Е. Ф., Артемьев М. В. Цитотоксическая и антипролиферативная активность производного бетулиновой кислоты // Актуальные проблемы медицины: материалы республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 30-летию юбилею Гомельского государственного университета, Беларусь, Гомель, 12–13 ноября 2020 г. / Гом. гос. ун-т.; редкол. И. О. Стома [и др.] – Гомель, 2020. – Т. 3. – С. 28–31.

12. Терпинская Т. И., Янченко Т. Л., Радченко А. В., Грибовская В. А., Полукошко Е. Ф., Артемьев М. В. Связывание с клетками и цитотоксическая активность наночастиц, включающих производное бетулиновой кислоты // Актуальные проблемы медицины: материалы республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 30-летию юбилею Гомельского государственного университета, Беларусь, Гомель, 12–13 ноября 2020 г. / Гом. гос. ун-т.; редкол. И. О. Стома [и др.] – Гомель, 2020. – Т. 3. – С. 32–35.

13. Радченко А. В., Грибовская В. А. Влияние состава производного амфифильного полимера на физико-химические свойства водорастворимых инкапсулированных нанокристаллов CdSe/ZnS // ЛОМОНОСОВ–2021: материалы Междунар. молодежн. науч. форума, Россия, Москва, 12–13 апреля 2021 г. /

редкол.: И. А. Алешковский [и др.]– М.: МАКС Пресс, 2021. – [Электронный ресурс] 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

14. Терпинская Т. И., Янченко Т. Л., Радченко А. В., Полукошко Е. Ф., Артемьев М. В. Влияние флуоресцентных полупроводниковых наночастиц с различным дзета-потенциалом на жизнеспособность клеток и образование активных форм кислорода // Сахаровские чтения 2021 года: экологические проблемы XXI века: материалы 21-й междунар. науч. конф., Беларусь, Минск, 20–21 мая 2021 г. / Междунар. гос. экол. ин-т им. А.Д. Сахарова Бел. гос. ун-та; редкол. : А. Н. Батян [и др.]. – Минск: ИВЦ Минфина, 2021. – Ч. 1. – С. 338–341.

Тезисы докладов

15. Fedosyuk A., Radchanka A., Antanovich A., Prudnikau A., Kvach M.V., Shmanai V., Artemyev M. Quantification of amphiphilic polymer molecules on the surface of hybrid luminescent nanocrystal-polymer composites for biomaging // Open readings 2017: Book of abstracts of 60th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences, Lithuania, Vilnius, March 14–17, 2017; ed.: Edvinas Skliutas [et al.]. – Vilnius, 2017. – P. 298.

16. Radchanka A., Terpinskaya T., Balashevich T., Yanchanka T., Artemyev M. Luminescent quantum dots encapsulated by zwitterionic amphiphilic polymer: calcium-dependent interaction with cells // Open readings 2019: Book of abstracts of 62th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences, Lithuania, Vilnius, March 19–22, 2019; ed.: Edvinas Skliutas [et al.]. – Vilnius, 2019. – P. 253.

17. Янченко Т. Л., Радченко А. В. Взаимодействие квантовых точек и квантовых нанопластин с клетками глиомы С6 // Молодежь в науке – 2019: тез. докл. XVI междунар. конф. молодых ученых, Беларусь, Минск, 14–17 октября 2019 г. / Нац. акад. наук Беларуси, Совет молодых ученых; редкол.: В.Г. Гусаков [и др.]. – Минск: Беларуская навука, 2018. – Ч. 2. – С. 237–238.

18. Radchanka A., Hrybouskaya V. Water-soluble semiconductor core-shell nanocrystals with controlled surface charge // Open readings 2020: Book of abstracts of 63th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences, Lithuania, Vilnius, March 17–20, 2020; ed.: Edvinas Skliutas [et al.]. – Vilnius, 2020. – P. 290.

19. Iodchik A., Radchanka A., Terpinskaya T., Balashevich T., Yanchanka T., Palukoshka A., Sizova S., Oleinikov V., Feofanov A., Artemyev M. Cadmium chalcogenide nanoplatelets for cell labeling and visualization with two-photon excitation // Open readings 2020: Book of abstracts of 63th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences, Lithuania, Vilnius, March 17–20, 2020; ed.: Edvinas Skliutas [et al.]. – Vilnius, 2020. – P. 290.

20. Radchanka A., Achshtein A.W., Artemyev M.V. Tunability of optical properties of water-soluble semiconductor nanocrystals via zeta-potential // Open readings 2020: Book of abstracts of 63th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences, Lithuania, Vilnius, March 17–20, 2020; ed.: Edvinas Skliutas [et al.]. –

Vilnius, 2020. – P. 292.

21. Radchanka A., Hrybouskaya V., Terpinskaya I. Effect of betulinic acid in the polymeric shell of encapsulated quantum dots on their interaction with cells // Open readings 2021: Book of abstracts of 63th International Conference for Students of Physics and Natural Sciences, Lithuania, Vilnius, March 16–19, 2021; ed.: Edvinas Skliutas [et al.]. – Vilnius, 2021. – P. 195.

22. Терпинская Т. И., Янченко Т. Л., Радченко А. В., Полукошко Е. Ф., Грибовская В. А., Артемьев М. В. Влияние флуоресцентных полупроводниковых наночастиц с различным зарядом оболочки на жизнеспособность и пролиферацию клеток *in vitro* // Современные проблемы клеточной инженерии, иммунологии и аллергологии : тез. докл. междунар. конф., Беларусь, Минск, 20–21 мая 2021 г. / редкол. : А. Е. Гончаров [и др.]. – Минск, 2021. – С. 14.

23. Терпинская Т. И., Янченко Т. Л., Радченко А. В., Полукошко Е. Ф., Грибовская В. А., Артемьев М. В. Участие протеинкиназ в поглощении клетками флуоресцентных наночастиц с полимерной оболочкой // Физико-химическая биология как основа современной медицины: тез. докл. междунар. конф., посвященной 75-летию со дня рождения Е. В. Барковского, Беларусь, Минск, 21 мая 2021 г. / редкол. : В. В. Хрусталёв [и др.]. – Минск: БГМУ, 2021. – С. 294–296.

24. Ranishenka B., Ulashchik E., Kruhlik A., Radchanka A. Tunable modification of water-soluble semiconductor QDs for bioconjugation // Saint Petersburg OPEN 2021: book of abstracts of 8th International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures, Russia, Saint Petersburg, 25–28 May, 2021 / ed. : A. E. Zhukov [et al.] – Saint Petersburg: HSE University, 2021. – P. 426–427.

РЕЗЮМЕ

Радченко Александра Валерьевна

Инкапсулирование коллоидных полупроводниковых нанокристаллов производными поли(малеинового ангидрида-альт-1-тетрадецена) для регулирования их физико-химических и биологических свойств

Ключевые слова: полупроводниковые нанокристаллы, фотолюминесценция, инкапсуляция, клеточное маркирование, биоконъюгация.

Цель работы: разработать методы химической модификации полимерной оболочки гидрофильных люминесцентных полупроводниковых нанокристаллов (НК) различными функциональными группами для контроля гидродинамического размера и дзета-потенциала НК в водных дисперсиях и установить механизмы влияния поверхностного заряда нанокристаллов и природы функциональных групп на физико-химические и биологические свойства коллоидных НК.

Объекты исследования: водные дисперсии полупроводниковых НК соединений $A^{IV}B^{VI}$ типа «ядро-оболочка», находящиеся в различных режимах размерного квантования (0D – CdSe/ZnS и ZnSe/ZnS, 1D – CdS/ZnS, 2D – CdSSe/ZnCdS), инкапсулированных в амфифильную полимерную оболочку на основе химически модифицированного поли(малеинового ангидрида-альт-1-тетрадецена) (ПМАТ).

Методы исследования: оптическая спектроскопия, динамическое рассеяние света, проточная цитофлуометрия, флуоресцентная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, ядерный магнитный резонанс, инфракрасная спектроскопия.

Полученные результаты: методики химической модификации ПМАТ и инкапсуляции гидрофобных люминесцентных НК соединений $A^{IV}B^{VI}$ типа «ядро-оболочка». Взаимосвязь площади поверхности НК соединений $A^{IV}B^{VI}$ и концентрации ПМАТ на их поверхности после процедуры инкапсуляции для количественной оценки содержания полимера и активных функциональных групп. Зависимость и механизм тушения квантового выхода флуоресценции (ФЛ) квантовых точек (КТ) CdSe/ZnS, инкапсулированных в производные ПМАТ, от их ζ -потенциала в водной дисперсии.

Зависимость эффективности ФЛ окрашивания и активации механизмов эндцитоза в ряде раковых клеточных культур от ζ -потенциала и состава полимерной оболочки КТ CdSe/ZnS. Новый тип меток с двухфотонным возбуждением ФЛ на основе КТ и квантовых нанопластин соединений $A^{IV}B^{VI}$, инкапсулированных в цвиттер-ионную оболочку производного ПМАТ.

Области применения: флуоресцентные трейсеры и метки, биоконъюгаты.

РЭЗЮМЭ

Радчанка Аляксандра Валер'еўна

Інкапсуляванне калоідных паўправадніковых нанакрышталёў вытворнымі полі(малеінавага ангідрыду-альт-1-тэтрадэцэну) для рэгулявання іх фізіка-хімічных і біялагічных уласцівасцяў

Ключавыя словы: паўправадніковыя нанакрышталі, фоталюмінесцэнцыя, інкапсуляцыя, клеткавае маркіраванне, біякан'югацыя.

Мэта работы: распрацаваць метады хімічнай мадыфікацыі палімернай абалонкі гідрафільных люмінесцэнтных паўправадніковых нанакрышталёў (НК) рознымі функцыянальнымі групамі для кантролю гідрадынамічнага памеру і дзэта-патэнцыяла НК у водных дысперсіях і ўсталяваць механізмы ўплыву павярхоўнага зараду нанакрышталёў і прыроды функцыянальных групаў на фізіка-хімічныя ўласцівасці.

Аб'екты даследавання: водныя дысперсіі паўправадніковых НК злучэнняў $A^{II}B^{VI}$ тыпу «ядро-абалонка», якія знаходзяцца ў розных рэжымах размернага квантавання (0D – CdSe/ZnS і ZnSe/ZnS, 1D – CdS/ZnS, 2D – CdSSe/ZnCdS), інкапсуляваных у вытворчыя хімічна мадыфікаванага полі(малеінавага ангідрыду-альт-1-тэтрадэцэну) (ПМАТ).

Метады даследавання: аптычная спектраскапія, дынамічнае расейванне святла, праточная цытафлуарыметрыя, флуарэсцэнтная мікраскапія, прасвятляльная электронная мікраскапія, ядрывы магнітны рэзананс, інфрачырвоная спектраскапія.

Атрыманыя вынікі: метадыкі хімічнай мадыфікацыі ПМАТ і інкапсуляцыі гідрафобных люмінесцэнтных НК злучэнняў $A^{II}B^{VI}$ тыпу «ядро-абалонка». Узаемасувязь велічыні плошчы паверхні НК злучэнняў $A^{II}B^{VI}$ і канцэнтрацыі ПМАТ на іх паверхні пасля працэдуры інкапсуляцыі для колькаснага разліку канцэнтрацыі палімера і актыўных функцыянальных груп. Залежнасць і механізм тушэння квантавага выхаду флуарэсцэнтных (ФЛ) квантавых кропак (КК) CdSe / ZnS, інкапсуляванага ў вытворчыя ПМАТ, ад іх ζ -патэнцыяла ў водных дысперсіях.

Залежнасць эфектыўнасці ФЛ афарбоўвання і актывацыі механізмаў эндацытозу ў шэрагу ракавых клеткавых культур ад ζ -патэнцыяла і складу палімернай абалонкі КК CdSe / ZnS. Новы тып пазнак з двухфатонным узбуджэннем ФЛ на аснове КК і квантавых нанасцінак злучэнняў $A^{II}B^{VI}$, інкапсуляванага ў цвітэр-іённую абалонку вытворчага ПМАТ.

Галіны выкарыстання: флуарэсцэнтныя трэйсеры і пазнакі, біякан'югаты.

SUMMARY

Radchanka Aliaksandra Valeryeuna

Encapsulation of colloidal semiconductor nanocrystals with poly(maleic anhydride-*alt*-1-tetradecene) derivatives to control their physicochemical and biological properties

Keywords: semiconductor nanocrystals, photoluminescence, encapsulation, cell labeling, bioconjugation.

Objective: development of methods for the chemical modification of the polymeric shell of hydrophilic luminescent semiconductor nanocrystals with various functional groups to control the hydrodynamic size and zeta potential of nanocrystals (NCs) in aqueous colloidal solutions and to define the mechanisms of influence of the surface charge of NCs and the nature of functional groups on the physicochemical and biological properties of colloidal NCs.

Objects of the study: aqueous colloidal solutions of semiconductor core-shell NCs $A^{II}B^{VI}$ with different dimensionality (0D - CdSe/ZnS and ZnSe/ZnS, 1D - CdS/ZnS, 2D - CdSSe/ZnCdS) encapsulated with an amphiphilic polymeric shell – chemically modified poly(maleic anhydride- *alt*-1-tetradecene) (PMAT).

Methods: optical spectroscopy, dynamic light scattering, flow cytometry, fluorescence microscopy, transmission electron microscopy, nuclear magnetic resonance, infrared spectroscopy.

Obtained results: original methods of chemical modification of PMAT and encapsulation of hydrophobic luminescent core-shell NCs $A^{II}B^{VI}$ have been developed. The relationship between the surface area of encapsulated NCs and the concentration of PMAT chains has been defined and the content of the polymer and active functional groups quantified. The dependence of the photoluminescence (PL) quantum yield of CdSe/ZnS QDs encapsulated in PMAT derivatives on their zeta potential in an aqueous colloidal solution has been found and quenching mechanism has been proposed.

The effectiveness of PL staining and activation of endocytosis mechanisms in a number of cancer cell cultures on the zeta potential and composition of CdSe/ZnS polymer quantum dots (QDs) have been studied. A new type of fluorescent labels with two-photon PL excitation based on QDs and nanoplatelets $A^{II}B^{VI}$ encapsulated with a zwitterionic PMAT derivative have been developed.

Fields of application: fluorescent tracers and labels, bioconjugates.

