

# ВЛИЯНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ПОЛУПРОВОДНИКОВЫХ НАНОЧАСТИЦ С РАЗЛИЧНЫМ ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛОМ НА ИЗЖИВНОСТЬ КЛЕТОК И ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

## INFLUENCE OF FLUORESCENT SEMICONDUCTOR NANOPARTICLES WITH DIFFERENT ZETA POTENTIAL ON CELL VIABILITY AND FORMATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES

**Т. И. Терпинская<sup>1</sup>, Т. Л. Янченко<sup>1</sup>, А. В. Радченко<sup>2</sup>, Е. Ф. Полукошко<sup>1</sup>, М. В. Артемьев<sup>2</sup>**  
**T. I. Terpinskaya<sup>1</sup>, T. L. Yanchanka<sup>1</sup>, A. V. Radchanka<sup>2</sup>, A. F. Palukoshka<sup>1</sup>, M. Artemyev<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси,  
г. Минск, Беларусь  
biblio@fizio.bas-net.by

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт физико-химических проблем  
Белорусского государственного университета,  
г. Минск, Беларусь

<sup>1</sup>*Institute of Physiology, National Academy of Science of Belarus, Minsk, Belarus*

<sup>2</sup>*Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Belarus*

Исследовано влияние инкапсулированных в амфифильный полимер флуоресцентных полупроводниковых наночастиц типа «ядро-оболочка» CdSe/ZnS на образование активных форм кислорода и жизнеспособность клеток. Методом проточной цитометрии проводили исследования на клетках Hela и асцитной карциномы Эрлиха. Установлено, что положительный дзета-потенциал наночастиц способствует их связыванию с клетками, повышению клеточного уровня активных форм кислорода и снижению выживаемости. Показана индукция апоптотической и некротической гибели клеток, подвергшихся воздействию наночастиц со слабоположительным дзета-потенциалом.

The effect of polymer-encapsulated fluorescent semiconductor core-shell CdSe/ZnS nanoparticles on the formation of reactive oxygen species and cell viability has been studied. The studies were carried out on *Hela* and Ehrlich ascites carcinoma cells using the method of flow cytometry. It was shown that the positive zeta potential of nanoparticles promotes their binding to cells, an increase in the cellular level of reactive oxygen species and a decrease in survival. Induction of apoptotic and necrotic death of cells exposed to nanoparticles with positive zeta potential was shown.

**Ключевые слова:** наночастицы, квантовые точки, окислительный стресс, некроз, апоптоз.

**Keywords:** nanoparticles, quantum dots, oxidative stress, necrosis, apoptosis.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2021-1-338-341>

### Введение

Быстрый прогресс нанотехнологий и все более широкое применение наночастиц в промышленности и медицине диктует необходимость тщательного исследования токсических эффектов наноструктур. Это позволит определить рамки применения наночастиц, а также последствия их воздействия на человека и окружающую среду.

Флуоресцентные 0-мерные полупроводниковые наночастицы, получившие в научной литературе название квантовых точек, обладают широким спектром возбуждения, узким пиком флуоресценции, устойчивы к выгоранию, что является несомненным преимуществом над традиционными органическими флуорофорами. По этой причине квантовые точки рассматриваются как перспективные клеточные маркеры [1]. Ядро квантовых точек размером 2–10 нм состоит из элементов II–VI групп; чаще всего это ядра CdSe или CdTe, которые покрываются оболочкой ZnS, защищающей ядра от влияния внешней среды и улучшающей квантовый выход люминесценции частиц. Для гидрофилизации и биологической совместимости наночастицы покрывают оболочками различного состава, которые могут также включать таргетирующие молекулы, например, лиганды к рецепторам или антитела [2].

Все компоненты наночастиц могут вносить свой вклад в их биологические свойства [3]. Высокая поверхностная площадь нанокристаллов обуславливает их более выраженные биологические эффекты по сравнению с макрообъектами.

Механизмы цитотоксичности квантовых точек включают образование активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса [4]. При клеточном стрессе активные формы кислорода и азота окисляют различные биомолекулы, изменяя их активность, что отражается на физиологии клетки. При недостаточности механизмов антиоксидантной защиты происходит повреждение клеточных структур и индукция клеточной

гибели. Кроме того, можно предположить, что токсичность наночастиц будет зависеть не только от химического состава ядра и оболочки, но и от физических свойств нанокристаллов, в частности, от их поверхностного заряда.

Задачей данной работы было исследовать влияние флуоресцентных полупроводниковых наночастиц, обладающих различным поверхностным зарядом, на образование АФК и выживаемость клеток.

### Материалы и методы

**Наночастицы.** Для исследования использовали 3 типа нанокристаллов типа «ядро-оболочка» CdSe/ZnS, инкапсулированных в производные поли(малеинового ангидрид-альт-тетрадецена), отличающихся соотношением отрицательно заряженных карбоксильных групп или положительно заряженных четвертичных аммонийных остатков. Источником четвертичных аммонийных групп являлся (2-аминоэтил)триметиламмоний хлорид, который вводился в состав полимера посредством стандартной карбодимидной методики через образование амидной связи. Соотношение карбоксильных и четвертичных аммонийных групп полимерной оболочке определяет значение дзета-потенциала инкапсулированных нанокристаллов. Наночастицы, несущие в оболочке только отрицательно заряженные группы, характеризовались дзета-потенциалом  $-33$  мВ – (-)НЧ; несущие в оболочке и отрицательно, и положительно заряженные группы – дзета-потенциалом  $+13$  мВ – (-/+)НЧ (т. н. слабopоложительные); только положительно заряженные группы – дзета-потенциалом  $+22$  мВ – (+)НЧ (т. н. сильноположительные). Гидродинамический размер наночастиц составлял  $15\text{--}17$  нм, максимум флуоресценции  $\lambda = 580$  нм.

**Клетки.** Исследования проводили на клетках культивируемой линии *Hela* и перевиваемой мышинной опухоли асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ).

**Проведение экспериментов.** Клетки *Hela* снимали с чашек Петри без использования трипсина, после 5–7 минутной инкубации с изотоническим раствором хлорида натрия. Клетки АКЭ получали из брюшной полости мышей через 8–11 суток после внутрибрюшинной прививки этой опухоли. Клетки центрифугировали, ресуспендировали в физиологическом растворе, инкубировали с наночастицами 1 ч, отмывали от наночастиц в избытке среды культивирования (DMEM, Sigma) и культивировали в среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone) при  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$  в лунках культуральных планшетов.

Через 24 и 48 ч клетки снимали с использованием трипсина – ЭДТА и исследовали методом проточной цитометрии на цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson). Определяли интенсивность связывания клеток с наночастицами по флуоресценции клеток в области 580 нм, количество некротических клеток с помощью красителя 7-ААД (Sigma), количество апоптотических клеток – с помощью красителя Аннексин-V-450 (Sigma), уровень активных форм кислорода – с помощью красителя дигидрорадамин 123 (Molecular Probes by Life technologies), в последнем случае выделяя гейт живых клеток. Красители использовали согласно рекомендациям производителей. В каждой серии исследовали по 5 клеточных проб.

Статистический анализ полученного цифрового материала выполнен с помощью пакетов программ Excel и Statistica 7. Отличия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$  согласно тесту Манна-Уитни. Данные представлены в виде средней и ее ошибки.

### Результаты

При инкубировании в течение 24 ч клетки *Hela* были наиболее интенсивно маркированы (+) НЧ, в то время как (-) НЧ и (-/+) НЧ маркировали клетки в 1,3 и 1,4 раза слабее (рис. 1, а).

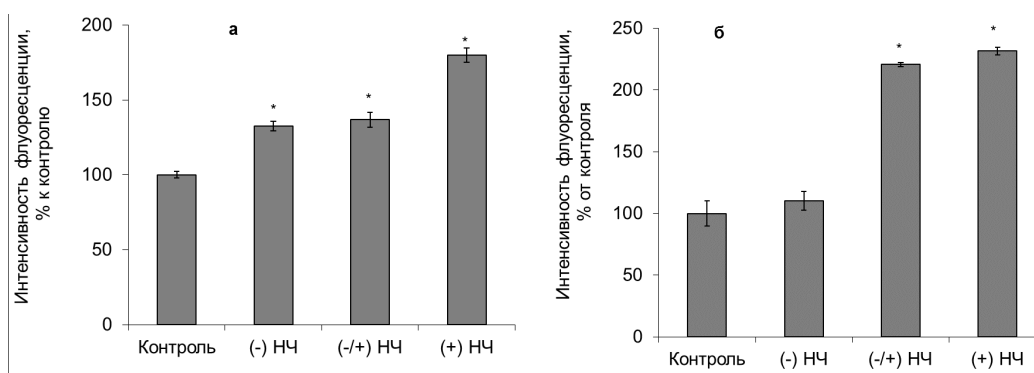


Рис. 1 – Интенсивность флуоресценции клеток *Hela* (а) и АКЭ (б) через 24 ч после окраски наночастицами; \* –  $p < 0,05$  при сравнении с контролем

Через 24 ч наблюдалась тенденция к снижению (на 5 и 4%) жизнеспособности клеток *Hela*, а через двое суток – статистически достоверное снижение, более выраженные в сериях, где клетки были окрашены слабо- или сильноположительными наночастицами – на 14 и 11% соответственно (рис. 2).

Уровень активных форм кислорода при действии (+) НЧ через 24 ч культивирования повышался более чем на 30%. Через 48 ч повышенный уровень образования активных форм кислорода выявлялся в клетках, окрашенных (-/+) НЧ и (+) НЧ. В клетках, окрашенных (-) НЧ, также наблюдалась тенденция к повышению уровня активных форм

кислорода (30%). Из рис. 3 видно, что наличие положительно заряженных групп в оболочке наночастиц способствовало более интенсивному образованию АФК в клетках.

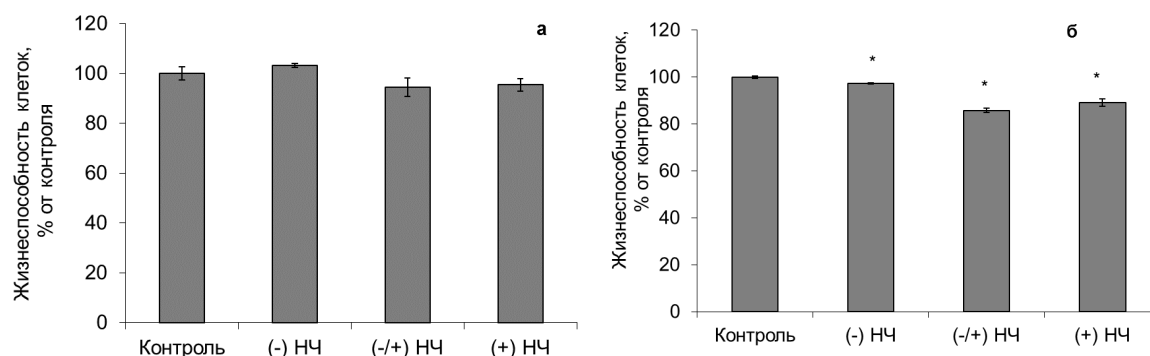


Рис. 2 – Влияние наночастиц на жизнеспособность клеток *Hela* через 24 (а) и 48 (б) ч после окраски; \* –  $p < 0,05$  при сравнении с контролем

Таким образом, наночастицы с сильноположительным дзета-потенциалом индуцируют повышение АФК через 24 ч, а наночастицы с цвиттер-ионной оболочкой – через 48 ч.

Далее изучали интенсивность некротической и апоптотической гибели под влиянием слабopоложительных (-/+) НЧ в клетках *Hela*. Показано, что через 48 ч процент живых клеток по сравнению с контролем снижен на 9%, при этом на 3% увеличивается количество клеток с маркерами некроза/позднего апоптоза и на 6% – с маркером раннего апоптоза, рис. 4.

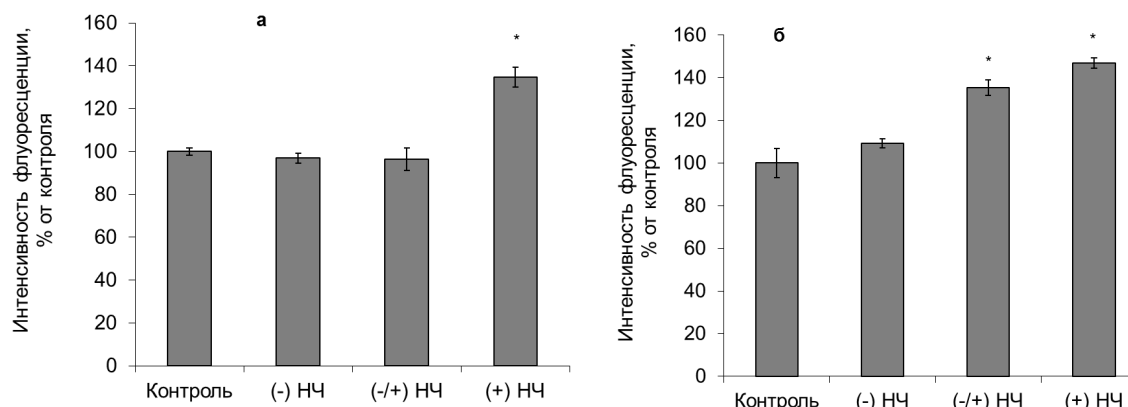


Рис. 3 – Влияние наночастиц на уровень образования активных форм кислорода в клетках *Hela* через 24 (а) и 48 (б) ч после окраски; \* –  $p < 0,05$  при сравнении с контролем



Рис. 4 – Пути клеточной гибели *Hela* под влиянием (-/+) НЧ (48 ч после окраски); \* –  $p < 0,05$

Сходные тенденции связывания наночастиц с клетками и усиления окислительного стресса отмечены при проведении опытов на клетках АКЭ. Через 24 ч клетки были интенсивно маркированы наночастицами с положительным дзета-потенциалом (рис. 1, б). Жизнеспособность снизилась незначительно по сравнению с контролем (в среднем, менее 1% в любой из серий, рис. 5, а), в то же время выявлено усиление образования АФК более чем на 40% в клетках, подвергшихся влиянию наночастиц с положительным дзета-потенциалом (рис. 5, б). Эта картина сходна с полученной для клеток *Hela* через 48 ч после окраски. Таким образом, клетки АКЭ оказались несколько более чувствительны к действию наночастиц, быстрее развивая признаки окислительного стресса, чем

*Hela*. Возможно, это обусловлено тем, что АКЭ не является культивируемой линией, и само нахождение вне организма является для этих клеток стрессом, который углубляется под действием наночастиц.

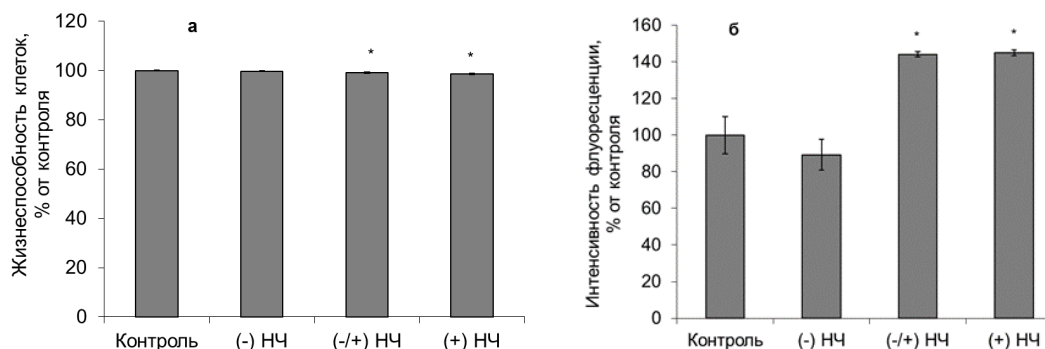


Рис. 5 – Влияние наночастиц на жизнеспособность клеток АКЭ (а) и на клеточный уровень активных форм кислорода (б) через 24 часа после окраски; \* –  $p < 0,05$  при сравнении с контролем

Положительный поверхностный заряд наночастиц способствует их связыванию с клетками, что демонстрируют как представленные выше, так и полученные нами ранее [5] результаты. Можно предположить, что положительно заряженные группы полимерной оболочки нанокристаллов способствуют также окислительному стрессу, активно взаимодействуя с отрицательно заряженными группами снаружи и внутри клетки. Более выраженная цитотоксичность наночастиц с положительным дзета-потенциалом, возможно, в значительной мере обусловлена их более интенсивным поглощением.

#### Заключение

Положительный дзета-потенциал наночастиц способствует их связыванию с клетками, повышению клеточного уровня активных форм кислорода и снижению выживаемости клеток. Показана индукция апоптотической и некротической гибели клеток, подвергшихся воздействию наночастиц со слабopоложительным дзета-потенциалом.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта БРФФИ №X20M-031 и ГПНИ ««Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорганомия», задание 2.1.04.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Петрова, Е. А. Полупроводниковые наночастицы селенида кадмия как флуоресцентные клеточные маркеры / Е.А. Петрова, Т.И. Терпинская, М.В. Артемьев, В.С. Улащик // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2015;59:5:55–61.
2. Wagner AM. Quantum dots in biomedical applications / Wagner AM, Knipe JM, Orive G, Peppas NA. // Acta Biomater. 2019;94:44–63.
3. Rzigalinski BA. Cadmium-containing nanoparticles: perspectives on pharmacology and toxicology of quantum dots / Rzigalinski BA, Strobl JS. // Toxicol Appl Pharmacol. 2009;238:3:280–288.
4. Duong HD. Effects of CdSe and CdSe/ZnS Core/Shell Quantum Dots on Singlet Oxygen Production and Cell Toxicity / Duong HD, Yang S, Seo YW, Rhee JI. // Journal of Nanoscience and Nanotechnologies. 2018;18;3:1568–1576.
5. Petrova E. Luminescent quantum dots encapsulated by zwitterionic amphiphilic polymer: surface charge-dependent interaction with cells / Petrova E, Terpinskaya T, Fedosyuk A, Radchanka A, Antanovich A, Prudnikau A, Artemyev M. // Journal of the Belarusian State University. Chemistry. 2018;1:3–13.

## АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ПРИОБРЕТЕННОЙ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ ANALYSIS OF THE INCIDENCE OF ACQUIRED APLASTIC ANEMIA AMONG CHILDREN IN THE REPUBLIC OF BELARUS

**В. С. Тышкевич, И. В. Пухтеева**  
**V. Tyshkevich, I. Puhteeva**

Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ  
г. Минск, Республика Беларусь  
valeria.tyshkevich@gmail.com  
Belarusian State University, ISEI BSU  
Minsk, Republic of Belarus