

СИНТЕЗ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ БОР-НИТРИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

SYNTHESIS AND INTRACELLULAR VISUALIZATION OF BORON-NITRIDE NANOPARTICLES

A. В. Богданова^{1,2}, С. В. Корень³, Е. Г. Фомина³, Т. А. Кулагова¹
A. V. Bahdanava^{1,2}, S. V. Koran³, E. G. Fomina³, T. A. Kulahava¹

¹Научно-исследовательское учреждение «Институт ядерных проблем» Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь
bahdanavanastasya@gmail.com

²Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

³Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, г. Минск, Республика Беларусь

¹*Institute for Nuclear Problems of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

²*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU Minsk, Republic of Belarus*

³*Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Republic of Belarus*

Бор-нитридные наночастицы (БННЧ) синтезированы гидротермическим методом. Исследованы спектрально-флуоресцентные свойства БННЧ и выявлена их стабильная флуоресценция в течение длительного времени. Установлено, что БННЧ являются биосовместимыми – накапливаются внутриклеточно и не оказывают токсического эффекта на клетки опухолевой линии Vero при длительном культивировании. БННЧ являются перспективным наноматериалом для биовизуализации и адресной доставки лекарственных препаратов.

Boron-nitride nanoparticles (BNNPs) were synthesized by the hydrothermal method and their Spectral and fluorescent properties of BNNPs were studied and the stable long-term fluorescence of these nanoparticles was shown. It has been established that BNNPs are biocompatible, they accumulate intracellularly and do not have a toxic effect on Vero cells. BNNPs are a promising nanomaterial for bioimaging and targeted drug delivery.

Ключевые слова: бор-нитридные наночастицы, клеточная линия Vero, гидротермический синтез, биосовместимость, флуоресценция, биовизуализация, флуоресцентная микроскопия

Keywords: boron-nitride nanoparticles, Vero cell line, hydrothermal synthesis, biocompatibility, fluorescence, bioimaging, fluorescence microscopy

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-364-367>

Использование разнообразных органических красителей для биовизуализации клеток, маркировки отдельных органелл, а также для оценки их функционального состояния является одним из наиболее популярных методов неинвазивного исследования биообъектов. Несмотря на такие преимущества органических красителей как низкая стоимость и хорошая биосовместимость, их использование ограничено фотообесцвечиванием или выгоранием, при котором интенсивность их флуоресценции снижается при длительном воздействии возбуждающего электромагнитного излучения УФ-видимого диапазона. Применение фотостабильных наночастиц с интенсивной флуоресценцией могло бы стать хорошей альтернативой существующим меткам и зондам для клеточной визуализации.

Бор-нитридные наночастицы (БННЧ) – нульмерные наноматериалы с графеноподобной структурой, образованной насыщенными шестичленными циклами с атомами В и N в вершинах. Экспериментальные исследования структурных и физико-химических свойств БННЧ, в зависимости от методов получения данных наночастиц, является весьма интересным и обширным направлением для изучения. Синтезированные и охарактеризованные на данный момент БННЧ, как правило, обладают интенсивной люминесценцией в диапазоне 400–480 нм, химической стабильностью и биосовместимостью [1]. Особый интерес к исследованию возможности накопления и визуализации БННЧ в клетках обусловлен тем, что данные наночастицы могут стать платформой для создания на их основе новых наноструктурированных лекарственных средств для нейтрон-захватной терапии – неинвазивного метода лечения труднодоступных опухолей [2].

В исследованиях [3-5] оценивали возможность применения БННЧ для биовизуализации и маркировки клеток *in vitro*. Противоречивые мнения, связанные с влиянием наночастиц на различные типы опухолевых клеток, а также с вопросом биосовместимости и цитотоксичности БННЧ, обусловлены отсутствием унифицированного метода синтеза таких наночастиц для биомедицинских применений.

БННЧ могут быть синтезированы с помощью подходов «сверху вниз» или «снизу вверх». Для нисходящего процесса гексагональный нитрид бора расслаивается на более тонкие нанолиты, а затем на наночастицы путем последовательного физико-химического воздействия. БННЧ, полученные такими методами синтеза, как правило, обладают хорошей кристаллической структурой, но полидисперсны по размеру, что значительно ограничивает их применение в биомедицинской сфере. Для восходящего подхода предшественники атомов В и N используются для «сборки» БННЧ. Данный подход позволяет лучше контролировать форму и размер БННЧ, но при этом уменьшается степень кристалличности [6]. Для возможности применения БННЧ в качестве биомедицинских препаратов актуальным является разработка восходящих методов синтеза БННЧ с регулируемыми размерами и оптическими свойствами для биовизуализации и адресной доставки препаратов. Цель исследования – осуществить синтез БННЧ, исследовать их флуоресцентные характеристики, а также биосовместимость и накопление в опухолевых клетках.

В данной работе БННЧ синтезировали гидротермическим методом при 200°C в течение 12 часов. В качестве прекурсоров для синтеза использовали борную кислоту и мочевины, в качестве среды для синтеза использовали смесь растворителей: этиловый спирт 97 %, дистиллированная вода, жидкий аммиак 10% в соотношении 2:2:1. После остывания в течение суток реакционной смеси наблюдалось выпадение осадка белого цвета. Образцы БННЧ центрифугировали при 3000 об/мин, отделяли выпавший осадок, а супернатант выливали в стеклянные чашки и проводили выпаривание жидкости при 37°C. Полученный после выпаривания порошок БННЧ использовали для приготовления водного раствора наночастиц с концентрацией 10 мг/мл. Далее проводили оценку спектрально-люминесцентных свойств данного раствора БННЧ путем регистрации спектров поглощения и флуоресценции с использованием спектрофлуориметра СМ2203 («Солар», Беларусь). Был также проведен микроскопический флуоресцентный анализ хлопковых волокон, пропитанных раствором БННЧ. Волокна хлопка погружали в раствор БННЧ в концентрации 10 мг/мл и дистиллированную воду (в качестве контрольного образца) на 2 часа. После этого волокна сушили и готовили микропрепараты для анализа.

Клетки Vero почки марьшши, полученные из коллекции культур ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии (г. Минск), в посевной дозе 300 тыс/мл были высажены в чашки Ibidi и проинкубированы в течение 24 часов с БННЧ в культуральной среде DMEM при 37°C. Перед добавлением БННЧ к клеткам, раствор пропускали через шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм. Для исследований были выбраны концентрации наночастиц в диапазоне от 10 до 200 мкг/мл. В качестве контрольного образца был проанализирован монослой клеток, инкубируемый с добавлением дистиллированной воды в том же объеме, что и наночастиц в исследуемые образцы. После окончания времени инкубирования, монослой клеток промывали и помещали в фосфатный буферный раствор (рН=7,4), после чего проводили флуоресцентную микроскопию.

Все микроскопические исследования проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония). Флуоресцентные микрофотографии были получены при возбуждении излучением на длине волны 365 нм.

На рисунке 1 представлены спектры поглощения и люминесценции водного раствора синтезированных БННЧ в концентрации 10 мг/мл. Установлено, что максимум поглощения БННЧ составляет 267 нм. Из полученных спектров флуоресценции БННЧ при возбуждении на разных длинах волн хорошо видно, что максимальная интенсивность флуоресценции была зарегистрирована при возбуждении на длине волны 320 нм с максимумом испускания на 405 нм. Квантовый выход флуоресценции БНКТ был рассчитан с использованием Stilbene 420 в качестве эталона и составил около 6%.

Хотя для БННЧ была зарегистрирована максимальная флуоресценция при возбуждении на длине волны 320 нм, ввиду приборных ограничений микроскопа адсорбцию БННЧ на волокнах хлопка и накопление в клетках регистрировали методом флуоресцентной микроскопии на длине волны 365 нм. Из анализа флуоресцентных изображений волокон хлопка (рисунок 2), которые были пропитаны раствором БННЧ стало очевидно, что синтезированные наночастицы способны хорошо адсорбироваться на пористой поверхности хлопковых волокон и давать стабильный флуоресцентный сигнал на протяжении 14 дней.

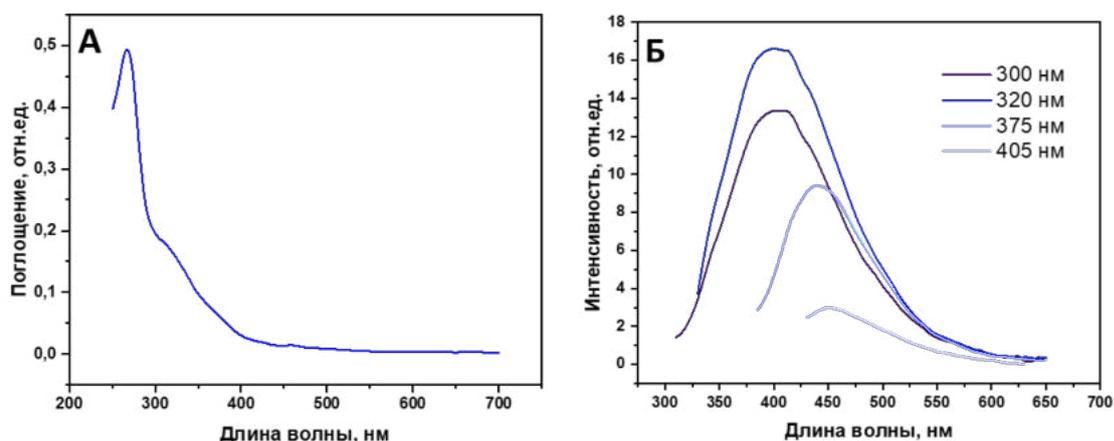


Рисунок 1 – Спектры поглощения (А) и флуоресценции (Б) водного раствора БННЧ в концентрации 10 мг/мл

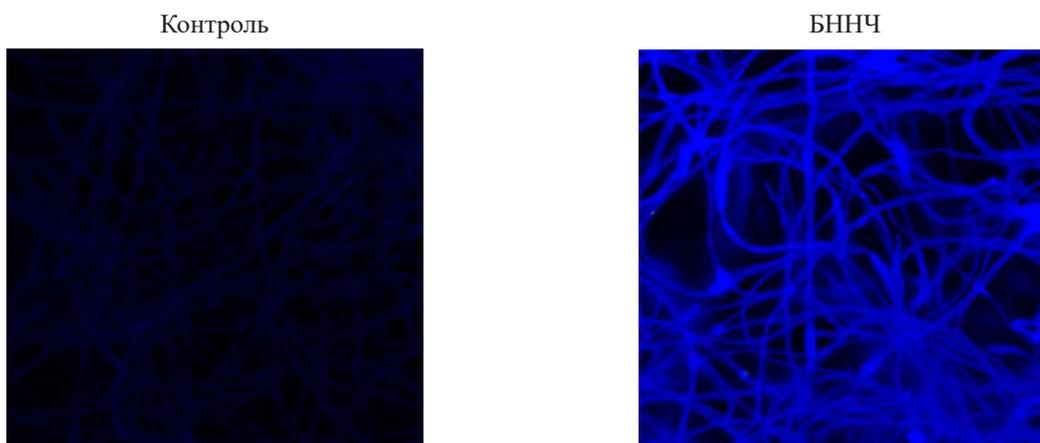


Рисунок 2 – Флуоресцентные микрофотографии хлопковых волокон, пропитанных дистиллированной водой (контроль) и водной суспензией БННЧ, при возбуждении на длине волны 365 нм

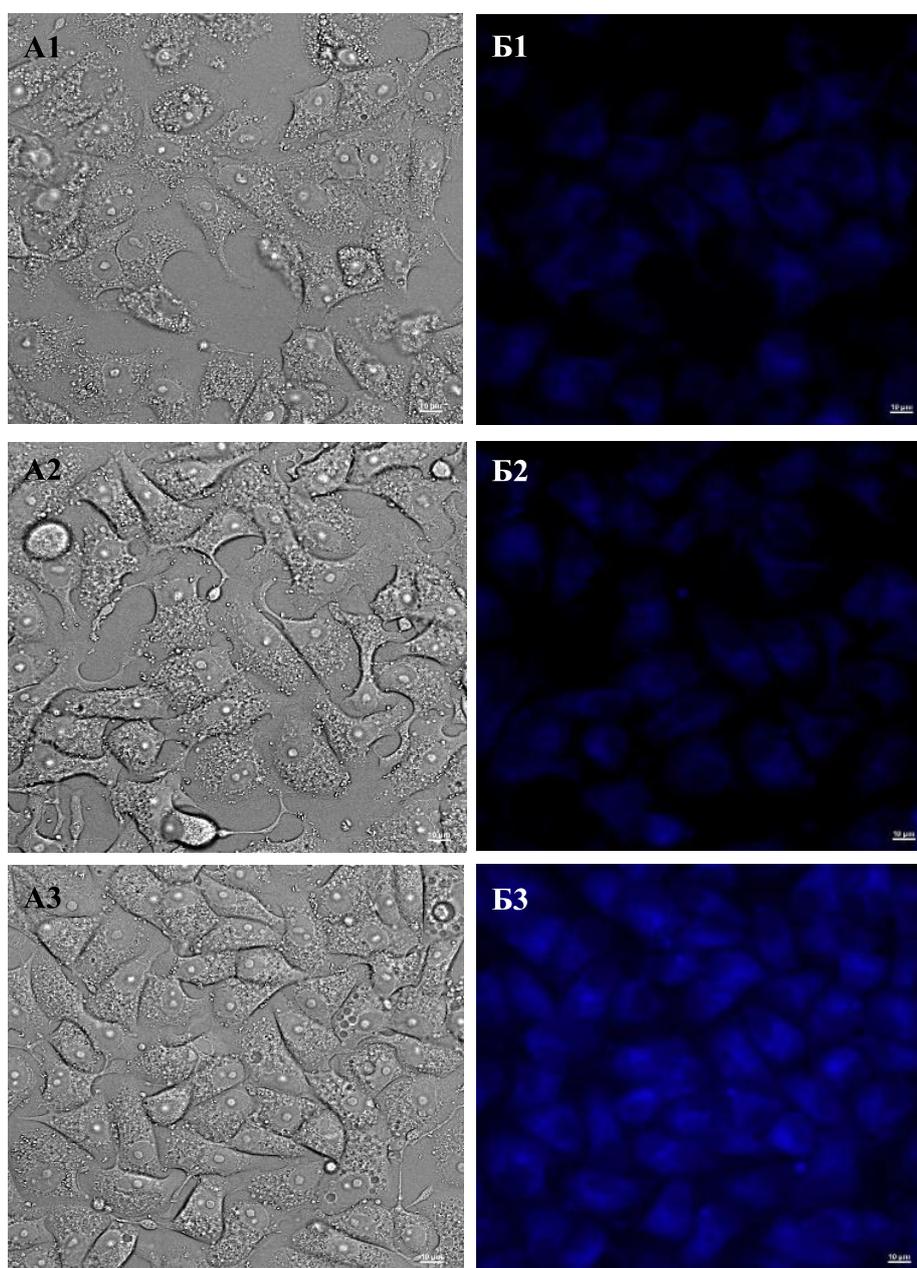


Рисунок 3 – Светлопольная (А) и флуоресцентная (Б) микроскопия клеток Vero в контрольном образце (1) и после инкубирования с БННЧ в концентрации 50 мкг/мл (2) и 200 мкг/мл (3)

Результаты исследования состояния клеточного монослоя после накопления БННЧ и флуоресценция БННЧ в клетках Vero представлены на рисунке 3. Из светлопольных микрофотографий (см. рисунок 3, А1-А3) хорошо видно, что инкубирование БННЧ с клетками в различных концентрациях не влияет на их жизнеспособность (форма, размер и количество клеток не отличаются от контрольного образца). Наличие интенсивной аутофлуоресценции клеток на длине волны 365 нм и низкий квантовый выход люминесценции БННЧ значительно осложняют визуализацию БННЧ в клетках методом флуоресцентной микроскопии (рисунок 3, Б1-Б3). Тем не менее применение высоких концентраций БННЧ (100 и 200 мкг/мл) позволило зарегистрировать накопление наночастиц в клетках, о чем свидетельствует усиленный сигнал флуоресцентной микроскопии, представленный на рисунке 3, Б3. Накопления БННЧ в более низких концентрациях (10 и 50 мкг/мл) в клетках Vero зарегистрировать при таком виде анализа не удалось.

Таким образом, в данном исследовании из борной кислоты и мочевины был осуществлен восходящий гидротермический синтез БННЧ с максимумом флуоресценции на длине волны 405 нм, при возбуждении на длине волны 320 нм. Данные наночастицы являются фотостабильными при адсорбции на хлопковых волокнах на протяжении 14 дней. Выявлено, что БННЧ не оказывают цитотоксического действия на опухолевые клетки Vero, накапливаются в них и при добавлении в концентрациях от 200 мкг/мл хорошо визуализируются методом флуоресцентной микроскопии. БННЧ являются перспективным наноматериалом для биовизуализации, адресной доставки лекарственных препаратов нейтрон-захватной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hexagonal boron nitride quantum dots: Properties, preparation and applications / X. Zhang [et al.] // Mater. Today Chem. – 2021. – Vol. 20. – P. 1–17.
2. Coderre, J.A. The radiation biology of boron neutron capture therapy / J. A. Coderre, G. M. Morris // Radiation Research. – 1999. – Vol. 151, № 1. – P. 1–18.
3. Defect engineering route to boron nitride quantum dots and edge-hydroxylated functionalization for bio-imaging / J.H. Jung [et al.] // RSC Adv. – 2016. – Vol. 6. – P. 73939–73946.
4. Fabrication and luminescence of monolayered boron nitride quantum dots / L. Lin [et al.] // Small. – 2013. – Vol. 10. – P. 60–65.
5. Liu, Q. One-pot solvothermal synthesis of water-soluble boron nitride nanosheets and fluorescent boron nitride quantum dots / Q. Liu, C. Hu, X. Wang // Mater. Lett. – 2019. – Vol. 234. – P. 306–310
6. One-step synthesis of boron nitride quantum dots: simple chemistry meets delicate nanotechnology / B. Liu [et al.] // Chem-Eur. J. – 2016. – Vol. 22. – P. 18899–18907.

ВОЗДЕЙСТВИЕ НА КОЖУ ЦИНКА И ЕГО ОКСИДА /В СОСТАВЕ КОСМЕТИЧЕСКОЙ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ

SKIN EXPOSURE TO ZINC AND ITS OXIDE IN COSMETIC AND MEDICINAL PRODUCTS

Е. А. Федулова, М. А. Кашинская, В. Д. Серченя, С. Н. Чигирь

E. A. Fedulova, M. A. Kashinskaya, V. D. Serchenya, S. N. Chigir

*Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ
Минск, Республика Беларусь
holyfirsh@mail.ru*

*International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus*

В статье рассматривается влияние как цинка, так и его оксида на состояние кожи при использовании косметической и лекарственной продукции. Цинк обладает рядом важных свойств: участвует в развитии, формировании и восстановлении тканей и является важным компонентом некоторых белков, в том числе участвующих во вкусе и запахе. В связи с вышеперечисленными свойствами цинк и его оксид добавляют в состав лекарственных и косметических средств для лечения проблем с кожей.

The article deals with the influence of both zinc and its oxide on skin condition when using cosmetic and medicinal products. Zinc has a number of important properties: it participates in the development, formation and repair of tissues and is an important component of some proteins, including those involved in taste and odor. Because of the above properties, zinc and its oxide are added to medicinal and cosmetic products to treat skin problems.

Ключевые слова: цинк, цинкит, регенерация, абсорбция, ткани, крем, ультрафиолет, акне, аллергия, дерматит.
Keywords: zinc, zinckite, regeneration, absorption, tissue, cream, ultraviolet, acne, allergy, dermatitis.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2024-1-367-370>