

## ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАНОЧАСТИЦ И ИХ СВЯЗЫВАНИЕ С КЛЕТКАМИ

**Терпинская Т.И.**

*кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник  
государственного научного учреждения Институт физиологии НАН  
Беларуси, г. Минск, Беларусь  
terpinskayat@mail.ru;*

**Янченко Т.Л.**

*младший научный сотрудник государственного научного учреждения  
Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
tanyaya190@gmail.com;*

**Радченко А.В.**

*научный сотрудник лаборатории нанохимии НИИ физико-химических  
проблем, г. Минск, Беларусь  
aleksandrardchenko10@gmail.com;*

**Грибовская В.А.**

*стажер младшего научного сотрудника лаборатории нанохимии НИИ  
физико-химических проблем, г. Минск, Беларусь  
hrybouskaya.varvara@gmail.com*

**Полукошко Е.Ф.**

*научный сотрудник государственного научного учреждения Институт  
физиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь  
efpoluko@list.ru;*

**Артемьев М.В.**

*доктор химических наук, заведующий лабораторией нанохимии НИИ физико-  
химических проблем, г. Минск, Беларусь  
m\_artemyev@yahoo.com*

**Аннотация.** Исследовано влияние среды культивирования на физико-химические и биологические характеристики флуоресцентных полупроводниковых наночастиц, покрытых амфифильным полимером. Показано, что при взаимодействии обладающих различным зарядом наночастиц со средой культивирования увеличивается гидродинамический размер наночастиц, все они приобретают отрицательный дзета-потенциал, сглаживается разница в дзета-потенциале и связывании с клетками между различно заряженными наночастицами.

**Ключевые слова:** наночастицы; квантовые точки; белковая корона

**THE EFFECT OF THE CULTURE MEDIUM ON THE  
PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF NANOPARTICLES AND  
THEIR BINDING TO CELLS**

***Terpinskaya T.I.***

*Candidate of Biology, Leading Researcher, Institute of Physiology, National  
Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus  
terpinskayat@mail.ru*

***Yanchanka T.L.***

*Junior Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of  
Belarus, Minsk, Belarus  
tanyaya190@gmail.com;*

***Radchanka A.V.***

*Researcher, Research Institute for Physical Chemical Problems, Minsk, Belarus  
aleksandraradchenko10@gmail.com;*

***Hrybouskaya V.A.***

*Trainee Junior Researcher, Research Institute for Physical Chemical Problems,  
Minsk, Belarus  
hrybouskaya.varvara@gmail.com*

***Palukoshka A.F.***

*Researcher, Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,  
Minsk, Belarus  
efpoluko@list.ru;*

***Artemyev M.V.***

*Doctor of Chemistry, Head of the Laboratory of Nanochemistry, Research Institute  
for Physical Chemical Problems, Minsk, Belarus  
m\_artemyev@yahoo.com*

***Annotation.*** *The influence of the culture medium on the physicochemical and biological characteristics of fluorescent semiconductor nanoparticles coated with an amphiphilic polymer has been studied. It has been shown that when differently charged nanoparticles interact with the culture medium, the hydrodynamic size of nanoparticles increases, all of them acquire a negative zeta potential, and the difference in zeta potential and binding to cells between differently charged nanoparticles is smoothed out.*

***Keywords:*** *nanoparticles; quantum dots; protein crown*

Введение в среду культивирования *in vitro* или в кровотоки лекарственных и диагностических средств на основе наноносителей приводит к взаимодействию биологических компонентов с наноматериалами и формированию белковой короны. Почти все фармакологические, токсикологические и транспортные характеристики наночастиц существенно зависят от образования белковой короны. Исходя из этого, весьма важным является исследование изменений свойств наночастиц с различным дзета-потенциалом после взаимодействия с компонентами среды, используемой для культивирования клеток.

Цель данной работы – изучить влияние среды культивирования на физико-химические характеристики и связывание с клетками наночастиц с различным зарядом.

#### **Материалы и методы.**

*Наночастицы.* Использовали флуоресцентные полупроводниковые наночастицы селенида кадмия (квантовые точки - QD) синтезированные согласно [1], с полимерной оболочкой, несущей отрицательные сульфонатные и положительные четвертичные аммонийные группы. Различное соотношение отрицательных и положительных групп в оболочке наночастиц обеспечивало их различный дзета-потенциал.

*Проведение экспериментов.* Суспензию наночастиц разводили в 5 раз водой для инъекций или средой RPMI-1640, дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Инкубировали 2 часа при комнатной температуре. После этого измеряли гидродинамический диаметр, дзета-потенциал и квантовый выход наночастиц с помощью прибора Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Великобритания).

При проведении биологических экспериментов клетки глиомы C6 и HeLa суспензировали в среде RPMI-1640 с 10% ЭТС. Вносили в клеточную суспензию наночастицы, заранее проинкубированные с водой или со средой RPMI-1640, дополненной 10% ЭТС, в соотношении 9:1. Инкубировали 30 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С. Анализировали методом проточной цитометрии с помощью цитофлуориметра BD FACS Canto II, Becton Dickinson (США) и методом флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа ЛЮМ 1 LED, Альтами (Россия).

При расчете интенсивности связывания (ИС) наночастиц с клетками учитывали квантовый выход люминесценции наночастиц и использовали формулу:  $ИС = (\text{значение флуоресценции, у.е.} * 100) / \text{КВЛ}$ , где КВЛ – квантовый выход люминесценции. КВЛ для контроля (клетки без обработки наночастицами) принимали за 100%.

### **Результаты.**

После взаимодействия с компонентами среды RPMI-1640, дополненной ЭТС, слабо- и сильноположительные наночастицы (QD+ и QD+/+) приобретали отрицательный заряд, заряд слабоотрицательных наночастиц (QD-) сдвигался в сторону более отрицательных значений, а заряд сильноотрицательных (QD-/-), напротив, сдвигался ближе к нейтральным значениям.

Зарегистрировано увеличение гидродинамического размера слабоотрицательных и сильноположительных наночастиц, и образование агрегатов сильноотрицательных наночастиц.

Квантовый выход сильноположительных наночастиц снижался в 9,6 раза, слабоположительных – в 11,1 раза, слабоотрицательных – в 4,8 раза, сильноотрицательных – в 3,9 раза.

Микроскопия показала, что как QD+, так и QD- поглощались клетками, распределяясь в цитоплазме в виде гранул. С учетом изменений квантового выхода наночастиц при их инкубации со средой RPMI-1640, дополненной ЭТС, была рассчитана интенсивность связывания наночастиц с клетками.

Рис. 1а показывает, что отрицательный заряд наночастиц, вероятно, способствовал их связыванию с клетками, так как инкубированные с водой QD- связывались с клетками в 4,4 раза лучше, чем QD+. Дополненная сывороткой среда RPMI-1640 усиливала связывание наночастиц с клетками глиомы С6 в 9,5 раза для QD+ и в 2,6 раза для QD-. Обработка наночастиц средой придавала отрицательный дзета-потенциал обоим типам наночастиц, и различия во взаимодействии QD- и QD+ с клетками стали менее выраженными – QD- связывались с клетками только в 1,2 раза лучше.

Из рис. 1б видно, что выявленные в опытах с глиомой С6 тенденции наблюдались и в опытах с клетками Hela. Отрицательный заряд наночастиц способствовал их связыванию с клетками – инкубированные в воде QD- связывались с клетками в 9 раз интенсивнее, чем QD+. Дополненная сывороткой среда RPMI усиливала связывание QD+ с клетками в 9,6 раза), QD- – в 2,1 раза.

При обработке средой RPMI-1640, дополненной сывороткой, различия во взаимодействии различных наночастиц с клетками становились значительно слабее – после обработки средой QD- связывались с клетками в 1,9 раза лучше, чем QD+.

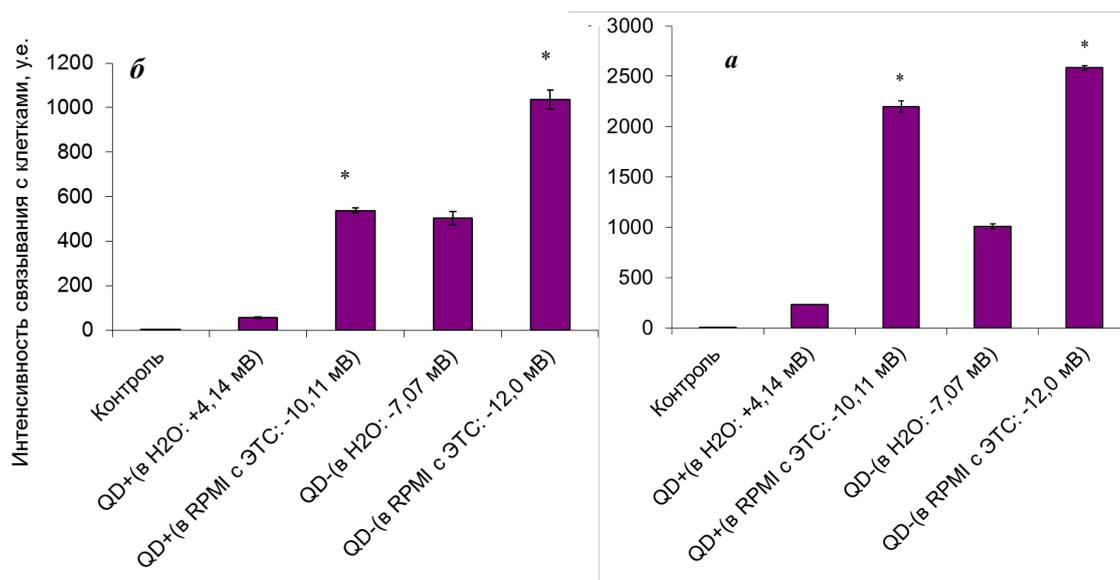


Рисунок 1 – Связывание клеток глиомы С6 (а) и HeLa (б) с наночастицами QD+ и QD-, предварительно проинкубированными с водой или со средой RPMI-1640 с 10% ЭТС, \*  $p < 0,05$  при сравнении наночастиц, обработанных водой или RPMI-1640 с ЭТС

При использовании сильно заряженных наночастиц дополненная сывороткой среда RPMI-1640 усиливала связывание с клетками HeLa как QD+/+ с сильным положительным зарядом (наблюдалось усиление связывания с клетками в 4,5 раза), так и QD-/- с сильным отрицательным зарядом (наблюдалось усиление связывания усиление в 3,1 раза). При этом заряд QD+/+ при обработке сывороткой снижался, а заряд QD-/- повышался, сдвигаясь в сторону нейтральных значений, рис. 2.

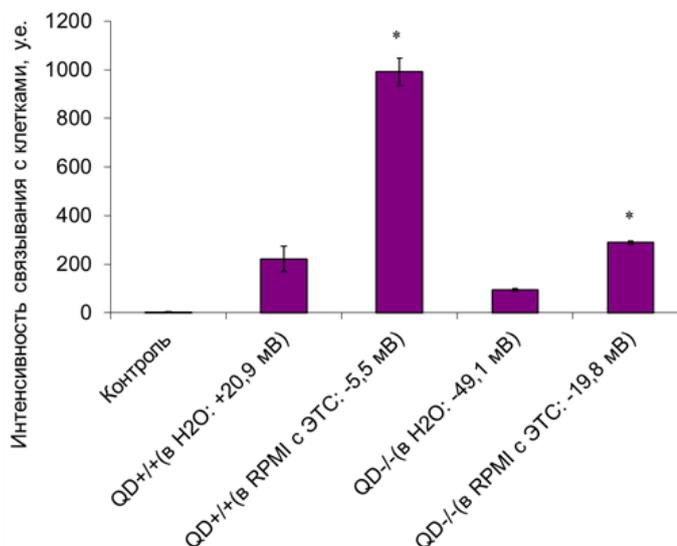


Рисунок 2 – Связывание клеток HeLa с наночастицами QD+/+ и QD-/-, предварительно проинкубированными с водой или со средой RPMI-1640 с 10% ЭТС, \*  $p < 0,05$  при сравнении наночастиц, обработанных водой или RPMI-1640 с ЭТС

Таким образом, инкубация в среде RPMI-1640, дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки, снижает дзета-потенциал сильно- и слабopоложительных, а также слабоотрицательных наночастиц, и сдвигает в сторону нейтральных значений дзета-потенциал сильноотрицательных наночастиц за счет формирования электростатически связанной протеиновой короны. Квантовый выход всех типов наночастиц снижается, наиболее значительно эффект выражен в положительно заряженных наночастицах. Гидродинамический размер слабоотрицательных и сильноположительных наночастиц увеличивается за счет формирования протеиновой короны, сильноотрицательные наночастицы образуют агрегаты. Наблюдается усиление связывания наночастиц с протеиновой короной с клетками, что наиболее выражено при использовании положительно заряженных наночастиц.

**Заключение.** Взаимодействие наночастиц с различным зарядом с компонентами среды культивирования изменяет их физико-химические и биологические свойства за счет формирования протеиновой короны. Увеличивается гидродинамический размер наночастиц, все они приобретают отрицательный дзета-потенциал, сглаживается разница в исходном дзета-потенциале наночастиц и связывании с клетками между различно заряженными наночастицами.

### Список литературы

1. Radchanka, A. Emitters with different dimensionality: 2D cadmium chalcogenide nanoplatelets and 0D quantum dots in non-specific cell labeling and two-photon imaging/ A. Radchanka, A. Iodchik, T. Terpinskaya et al. // Nanotechnology. – 2020. – V.31, № 43:435102.