

«ЗЕЛЕНИЙ» СИНТЕЗ КВАНТОВИХ ТОЧОК CdTe ТА ЇХ ВПЛИВ НА КЛІТИНИ ТВАРИН І ЛЮДИНИ

Л. ГАРМАНЧУК¹, М. БОРОВА³, О. КАПУШ², В. ДЖАГАН²,
М. ВАЛАХ², Я. БЛЮМ³, А. ЄМЕЦЬ³

¹ ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т. Шевченка,
просп. Академіка Глушкова, 2, Київ, 03022, Україна

² Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України,
просп. Науки, 41, Київ, 03028, Україна

³ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,
вул. Байди-Вишневецького, 2а, Київ, 04123, Україна

E-mail: yemets.alla@nas.gov.ua

Оскільки нанорозмірність у поєднанні з люмінесцентними властивостями та перспективними застосуваннями в різних галузях оптоелектроніки та біомедицини зумовлює зростаючий інтерес до вивчення особливостей квантових точок телуриду кадмію, нами було розроблено метод «зеленого» синтезу квантових точок CdTe з використанням культури міцелію *Pleurotus ostreatus* як біологічної матриці. При дослідженні їх фізико-хімічних характеристик було встановлено, що синтезовані квантові точки CdTe характеризуються кристалічною структурою, переважно сферичною морфологією та мають розмір 3–8 нм з максимумом люмінесценції у діапазоні 340–370 нм. При дослідженні їх впливу на різні типи клітин ссавців було виявлено, що квантові точки CdTe дозозалежним чином впливають на ендотеліальні клітини миші, еритроцити, Т- і В-лімфоцити людини та щура, клітини раку товстого кишечника (Colo 205) та раку молочної залози людини (MCF-7). Зокрема, спостерігали пригнічення проліферативних показників ендотеліоцитів та збільшення мертвих клітин, що вказує на цитотоксичну дію нанокристалічного CdTe та на його антипроліферативний ефект по відношенню до ендотеліальних клітин. Квантові точки CdTe в концентрації 5 мкМ проявляли гемолітичну активність за дії на еритроцити, впливали на адгезивні контакти та виживаність ракових клітин. При цьому клітини раку молочної залози людини (MCF-7) виявились більш чутливими до їх дії. Отримані дані є вкрай важливими для розуміння механізмів токсичності квантових точок CdTe для їх подальшого використання в біологічних та біомедичних дослідженнях.

Ключові слова: «зелений синтез», квантові точки, CdTe, токсичність, клітини людини, тваринні клітини, культура ракових клітин.

Вступ. Створення нанорозмірних матеріалів, в тому числі напівпровідникових нанокристалів,

є одним з основних напрямків сучасного матеріалознавства. Враховуючи зростаючий інтерес до застосування наночастинок в наукових дослідженнях і розробках, одним з пріоритетних напрямків нанотехнологій залишається розвиток «зеленого» синтезу квантових точок, придатних для біологічного або медичного застосування (Vorova et al, 2015a). Найбільш затребуваними на сьогоднішній день є стабільні біосумісні квантові точки з різними спектральними характеристиками, які можна використовувати для біоіміджингу (Zhang et al, 2007; Matea et al, 2017; Sahoo et al, 2019), тобто маркування клітин та внутрішньоклітинних детермінантів, терапії деяких видів раку (Fatima et al, 2021) та внутрішньоклітинної доставки певних біомолекул і сполук, зокрема з протипухлинною активністю (Zhao et al, 2016; Matea et al, 2017; Jha et al, 2018; Ruzyska-Ayoush et al, 2021). Використання квантових точок як флуоресцентних зондів для створення кон'югатів з відповідними антитілами (Sahoo et al, 2019; Yemets et al 2022) є сучасною альтернативою рутинним методам прямої імуофлуоресцентної мікроскопії для детекції різних субклітинних структур, зокрема залучених до поділу клітин, внутрішньоклітинного транспорту, клітинної архітектури та проліферації, тощо (Yemets et al, 2008; Blume et al, 2010; 2013).

Серед відомих синтезованих наночастинок різного хімічного складу саме квантові точки CdTe вважаються одними з найбільш перспективними у фотосенсоріці та біомедичних дослідженнях (Chen et al, 2012; Fan et al, 2014; Chang et al, 2019; Kadim, 2019; Kumar, 2022), оскільки вони є фотостабільними, мають до-

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2023

силь вужкий спектр випромінювання та високий квантовий вихід люмінесценції порівняно з широкоживаними зондами. На сьогодні існують поширені методи хімічного синтезу квантових точок CdTe, а саме: металорганічний синтез та водний синтез (Chen et al, 2012), однак ці підходи потребують специфічних безкисневих умов та дорогих токсичних стабілізаторів, таких, наприклад, як триоктилфосфін або триоктилфосфін оксид (Talarin et al, 2001; Pei et al, 2012). Для вирішення проблеми надмірної токсичності традиційних методів синтезу інтенсивно розвивається альтернативна технологія, яка базується на використанні різних типів біологічних об'єктів як матриць для стабілізації та отримання нанорозмірних частинок, зокрема, Cd-вмісних квантових точок. Варто відзначити, що біологічні об'єкти та матриці, отримані на їх основі, в першу чергу відіграють роль природних стабілізаторів, запобігаючи агрегації сформованих нанокристалів CdTe, регулюючи їх розміри, а також формуючи навколо них захисне органічне покриття (Bao et al, 2010a,b; Syed et al, 2013; Green et al, 2015; Jigyasu et al, 2020), що зменшує токсичний вплив отриманих квантових точок на навколишнє середовище (Nel et al, 2006). Отже, метою роботи було розробити методіку «зеленого» синтезу квантових точок CdTe з використанням біологічної матриці (культури міцелію базидіального гриба *Pleurotus ostreatus*), дослідити їх фізико-хімічні характеристики та вплив на різні типи клітин тварин і людини.

Матеріали та методи. «Зелений» синтез квантових точок CdTe. Синтез квантових точок CdTe проводили за методикою, описаною в роботі (Bao et al, 2010a) з деякими модифікаціями. Зокрема, як біологічну матрицю для синтезу цих наночастинок використовували культуру міцелію базидіального гриба *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (штам 551) з колекції шапінкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, особливості отримання якої детально описано нами в роботі (Vorova et al, 2015b), та наступних реагентів: хлориду кадмію, CdCl₂ («Acros», США, чистота 98 %); телуриду натрію, Na₂TeO₃ («Alfa Aesar», Німеччина, чистота 99,5 %) та бор-

гідриду натрію, NaBH₄ («Acros», США, чистота 98 %), як відновника. Синтез проводили наступним чином: у колбу з попередньо вирошеним міцелієм *P. ostreatus* додавали 0,1 М водного розчину CdCl₂, потім додавали 0,1 М Na₂TeO₃ та 50 мг NaBH₄. Після додавання відновника спостерігали поступову зміну кольору розчину з прозорого на темно-оранжевий/коричневий, далі отриманий зразок центрифугували протягом 10 хв при 5000 об/хв для видалення залишків грибної матриці та залишків неорганічних солей. Після центрифугування обережно відбирали надосадову рідину (розчин телуриду кадмію) для подальшого аналізу.

Дослідження властивостей квантових точок CdTe. Оптичні властивості отриманих нанокристалів CdTe досліджували за допомогою методу фотолюмінесцентної спектроскопії (ФЛ). Спектри ФЛ збуджувалися на лінії 325,0 нм He-Cd-лазера (10 мВт) і реєструвалися за допомогою автоматичного спектрометра MDR-23, обладнаного неохолоджуванним фотопомножувачем FEU-100.

Квантові точки CdTe характеризували за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії з використанням електронного мікроскопу JEOL, JEM-2100F (Японія). Прискорююча напруга приладу складала 200 кВ. Попередньо виконували ультразвукове перемішування зразків, після чого краплини розчинів зразків наносили на мідну сітку з вуглецевим покриттям. Осаджений при випаровуванні матеріал використовували для подальших досліджень.

Клітинні лінії, отримання та умови культивування клітин. Ймовірну токсичність квантових точок CdTe оцінювали, використовуючи різні лінії клітин, зокрема MAEC – лінію аортальних ендотеліальних клітин миші; еритроцити, первинні культури Т- і В-лімфоцитів щура та людини; MCF-7 – клітини раку молочної залози людини; Colo 205 – клітини раку товстого кишечника лінії.

Для культивування клітини досліджуваної лінії MAEC, що зберігались в умовах кріоконсервування в рідкому азоті, швидко розморожували при 37 °С на водяній бані. Після цього поміщали 1–2 мл клітинної суспензії в 25 мл середовища для культивування, акуратно перемішували. Осаджували клітини цен-

трифугуванням при 800 g впродовж 2–3 хв та видаляли супернатант, потім ресуспендували в середовищі повного складу (DMEM або RPMI-1640, «Sigma», США), що містило 5–20 % FBS («Sigma», США), та підраховували загальну кількість та співвідношення живих та мертвих клітин після зафарбовування останніх трипановим синім. Для культивування використовували клітини, кількість мертвих в яких не перевищувала 15 %.

Визначення токсикологічних ефектів на лімфоцити проводили відносно первинної культури лімфоцитів щура та людини. Лімфоцити виділяли з периферійної крові, отриманої від здорових донорів, шляхом центрифугування у градієнті фікол-верографін ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$), при 1000 g, впродовж 40 хв. Т- та В-лімфоцити із селезінки експериментальних тварин виділяли після подрібнення тканини та фільтрування через капронові фільтри до отримання однорідної суміші та проводили виділення лімфоцитів на градієнті, як описано вище. Для виявлення ефектів досліджуваних наночастинок на первинні культури лімфоцитів, останні культивували впродовж 3 діб в концентрації 1×10^6 /мл при 37 °C і 5 % CO₂ в повному живильному середовищі RPMI-1640 з додаванням 10% FBS, 200 ммоль/л глютаміну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину. Т- та В-лімфоцити розділяли з використанням методики розеткоутворення Т-лімфоцитів з еритроцитами барана. Для цього суміш лімфоцитів інкубували з еритроцитами барана у співвідношенні 1 : 10 впродовж 1 год за температури +4 °C, після чого суміш наносили на градієнт фіколу : верографіну та центрифугували впродовж 40 хв. На градієнті залишались В-лімфоцити, Т-лімфоцити, утворивши розетки з еритроцитами, випадали в осад. Від зв'язаних з Т-лімфоцитами еритроцитів у цій фракції позбавлялись шляхом лізису з використанням 2-х кратного фізіологічного розчину.

Для ізолювання еритроцитів отримували гепаринізовану кров щурів чи людини, з якої виділяли різні субпопуляції клітин. Еритроцити тричі відмивали фізіологічним розчином (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, рН 7,4) шляхом центрифугування по 5 хв

при 1500–2000 об/хв. Супернатант видаляли, а з осаду готували 1%-ну суспензію еритроцитів на фізіологічному розчині. До суспензії еритроцитів додавали нанокристалічний CdTe в широкому діапазоні концентрацій. Для дослідження використовували еритроцити, отримані з донорської крові людини, та щура, заготовленої на гемоконсерванті «Глюгіцир». Після видалення плазми еритромасу тричі відмивали центрифугуванням (центрифуга ОПн-3У4.2, 3000 об/хв, 3 хв) у 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину (0,15 моль/л NaCl, 0,01 моль/л фосфатний буфер, рН 7,4). Лейкоцитарну плівку і супернатант видаляли аспірацією. Еритроцити зберігали у вигляді щільного осаду не більше 4 год при 0 °C.

Клітини обробляли різними концентраціями CdTe шляхом перемішування клітинної суспензії (об'єм суспензії – 1 мл) за кімнатній температурі (22 °C). Рівень гемолізу еритроцитів через 1 год інкубації досліджували спектрофотометрично при довжині хвилі 543 нм. За 100 % приймали поглинання проби, в яку додавали тритон X-100 (0,1 %). Всі маніпуляції проводили відповідно до вітчизняних та міжнародних біоетичних норм.

Дослідження токсичності квантових точок CdTe. Оцінку виживаності клітин за дії квантових точок CdTe (1–20 мкМ) проводили з використанням вітального барвника трипанового синього (0,4%-ний розчин, приготований на 0,1 М PBS рН 7,2). Для цього з кожної лунки планшети відбирали по 2 проби для підрахунку співвідношення живих та мертвих клітин з використанням камери Горяєва. До суспензії клітин додавали рівний об'єм 0,4%-ного розчину трипанового синього, через 5 хв підраховували клітини в 5 великих квадратах, визначали середнє значення та кількість клітин/мл, враховуючи розведення клітин та об'єм інкубації.

Цитотоксичну/пропроліферативну дію досліджуваних агентів проводили *in vitro*, використовуючи колориметричний МТТ-тест, в основу якого покладено здатність мітохондріальних ферментів живої клітини відновлювати розчинений в фізіологічних розчинах 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ) («Sigma», США) – сіль

жовтого кольору в кристалічний МТТ-форма-зан лілового кольору (Mosmann et al, 1983). За 4 год до закінчення терміну інкубації клітин із досліджуваними агентами до культурального середовища вносили МТТ в об'ємі 20 мкл до кінцевої концентрації 0,6 мМ. Після інкубації з МТТ утворені кристали формазану в клітинах розчиняли у 100 мкл диметилсульфоксиду і фотометрували планшет на фотометрі при довжині хвилі 540 нм. Клітини аналізували за допомогою інвертованого мікроскопу AxioVert-40 (Carl Zeiss) з програмним забезпеченням Axio Vision.

Статистичний аналіз. Статистичну обробку даних проводили з використанням стандартних програм Statistica 8.0. Достовірність різниці між порівнюваними групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю $p < 0,05$.

Результати та обговорення. Для розробки методу «зеленого» синтезу квантових точок CdTe проводили серію досліджень по підборі ефективні концентрації вихідних сполук, а саме CdCl₂, Na₂TeO₃ та NaBH₄, враховуючи дані по отриманню нанокристалів телуриду кадмію за використання клітин дріжджів (Bao et al, 2010a). Біологічною матрицею для синтезу квантових точок CdTe слугувала культура міцелію базидіального гриба *Pleurotus ostreatus*, оскільки раніше за їх допомогою нами успішно було синтезовано квантові точки CdS (Vogova et al, 2015b), які характеризувались низькою токсичністю, порівняно з неорганічним кадмієм (Garmanchuk et al, 2019). Для підтвердження нанорозмірних властивостей CdTe аналізували спектральні та структурно-морфологічні особливості синтезованих зразків. Було встановлено, що у спектрах фотолюмінесценції спостерігався характерний зсув у короткохвильову область спектру, максимум люмінесценції квантових точок CdTe знаходився у діапазоні 340–370 нм (рис. 1, a). Зсув до короткохвильового діапазону довжин хвиль ймовірно пов'язаний зі зменшенням діаметру наночастинок, а також обумовлений особливостями біологічної матриці.

Найбільш точним методом оцінки розмірів квантових точок телуриду кадмію є безпосе-

редня візуалізація їх структури за допомогою електронної мікроскопії (як скануючої, так і просвічуючої). Цей метод дозволяє визначити не тільки розподіл за розмірами, а також оцінити ступінь агломерації наночастинок. На рис. 1, б наведено електронно-мікроскопічне зображення синтезованих нами квантових точок CdTe. Встановлено, що вони мали переважно сферичну морфологію та розмір в межах 3–8 нм, кристалічна структура також була типовою для телуриду кадмію. У результаті рентгеноспектрального аналізу було встановлено, що у синтезованому зразку присутня певна кількість хімічних домішок, зокрема наявні такі елементи, як K, I, Si, Cl у кількості, що не перевищує 10–15 %.

Отримані нами дані дещо відрізняються від результатів інших авторів по синтезу наночастинок CdTe. Зокрема, в роботі, де представлено метод позаклітинного біологічного синтезу CdTe з використанням *Fusarium oxysporum*, показано, що у спектрі люмінесценції даних квантових точок спостерігався симетричний максимум при довжині хвилі 475 нм, а розміри наночастинок становили 15–20 нм (Syed et al, 2013). У дослідженні, де було використано *Saccharomyces cerevisiae* для отримання квантових точок телуриду кадмію, встановлено, що для них характерним був максимум люмінесценції у діапазоні 490–560 нм, і вони мали кристалічну структуру та розміри в межах 2–4 нм. Автори стверджують, що отримані наночастинок мають високу інтенсивність люмінесценції, є водорозчинними, високостабільними, біосумісними та можуть бути використані як флуоресцентні зонди (Bao et al, 2010a). Подібні дані щодо синтезу квантових точок CdTe за використання *S. cerevisiae* нещодавно були отримані іншими авторами, які показали їх антипроліферативну активність по відношенню до клітин лінії аденокарциноми простати людини PC-3 (Jigyasu et al, 2020). Якщо порівнювати спектри хімічно синтезованих квантових точок CdTe, наприклад тих, які було стабілізовано тіогліколевою кислотою (Karush et al, 2014), то люмінесцентні максимуми таких наночастинок CdTe зміщені в область видимого світла і відповідають довжинам хвиль 550–580 (помаранчева область ви-

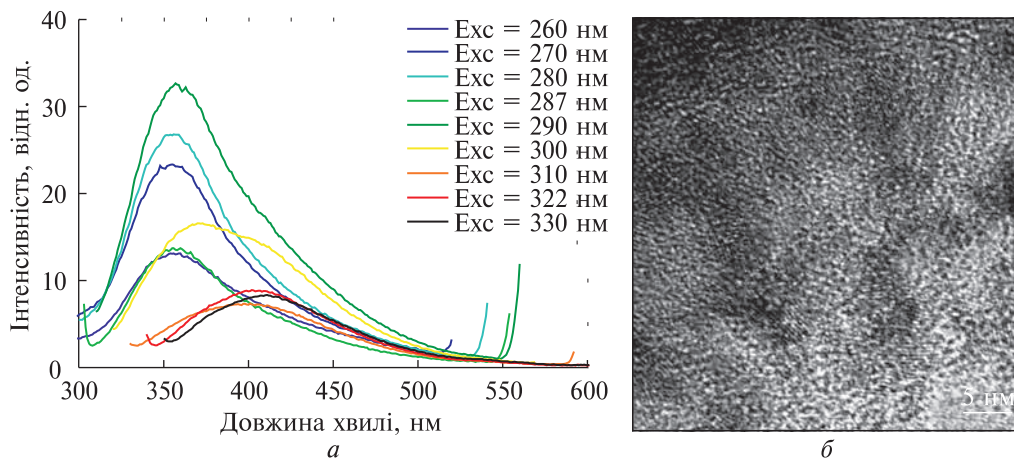


Рис. 1. Спектр фотолюмінесценції (а) та структура (б) наночастинок CdTe, отриманих за використання *P. ostreatus*

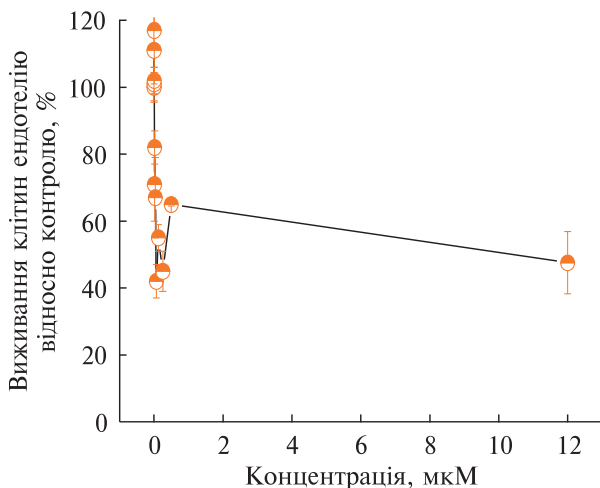


Рис. 2. Вплив квантових точок CdTe на виживаність ендотеліальних клітин

димого світла). Подібні оптичні параметри при-таманні, зокрема колоїдним нанокристалам телуриду кадмію (Osovsky et al, 2007).

Слід зазначити, що в процесі біологічного синтезу наночастинок можна виділити три основні складові: вибір біологічного об'єкта як вихідної матриці або середовища (екстракту) для проведення синтезу, тип вихідних хімічних реагентів та умови проведення реакції. Зазвичай, квантові точки, отримані за допомогою методу «зеленого» синтезу, є менш токсичними і мають незаперечні переваги перед тими, що синтезовані з використанням звичайних фізико-хімічних методів (Borova et

al, 2015a). Зокрема, «зелений» підхід є екологічно чистим і не потребує використання дорогих та небезпечних хімічних речовин, менш енергоємним та доступним в лабораторних умовах. Таким чином, «зелена» нанобіотехнологія є новим перспективним підходом, який дозволяє отримувати біосумісні стабільні наноматеріали. У «зеленому» синтезі зазвичай застосовується підхід, коли синтез опосередковується відновлюючими та стабілізуючими сполуками. При цьому особлива увага приділяється вибору безпечного та доступного біоматеріалу як кепінг-агенту, який стабілізує синтезовані наночастинок та робить їх біосумісними (Alvand et al, 2019).

Відомо, що наноматеріали мають унікальні властивості на нанорозмірному рівні та широкі перспективи щодо застосування в біологічних і біомедичних дослідженнях, та клінічній практиці (Aslan et al, 2008; Borova et al, 2015a, Yemets et al, 2022). Тому важливим аспектом у цих дослідженнях є оцінка безпечності наноматеріалів стосовно клітин різного генезу. Зазвичай для цього використовують клітинні лінії зі стандартними параметрами, що характеризуються проліферативними, метаболічними та диференційними показниками, а також первинні культури різних популяцій клітин (Liu and Tang, 2020). Наприклад, периферійна кров як джерело лейкоцитів, тромбоцитів та еритроцитів дозволяє визначати різні ефекти наноматеріалів з метою їх подальшого мож-

ливого системного впливу на багатоклітинний організм (de la Harpe et al, 2019). Також важливими клітинними мішенями впливу наноматеріалів є ендотеліальні клітини (Сао, 2018). Слід зазначити, квантові точки як нові агенти біоміджінгу (Kairdolf et al, 2013; Gil et al, 2021; Yemets et al, 2022) та доставки ліків (Matea et al, 2017; Jha et al, 2018; Badilli et al, 2020; Jan et al, 2022), зазвичай вводять в судинну систему шляхом ін'єкції і, через саме це вони безпосередньо можуть впливати на васкулярні ендотеліальні клітини (Xu et al, 2021). Тому першим важливим об'єктом дослідження ймовірних токсичних ефектів біологічно синтезованих квантових точок CdTe було вивчення їх впливу на клітини ендотелію. Для цього використовували клітини аортального ендотелію миші, здатні в іморталізованій культурі проявляти ознаки диференціювання за умов обмеження їх ростових характеристик субстратом та наявністю поживних субстратів. Прояв їх диференціального фенотипу виражається у формуванні тяжів ендотелію, що відображає етап формування судин. При визначенні впливу нанокристалічного CdTe на культивовані ендотеліоцити в МТТ-тесті, було виявлено пригнічення їх проліферативних показників (50 % від контролю), починаючи з концентрації 5 мМ (рис. 2).

При визначенні співвідношення живих та мертвих клітин за впливу різних концентрацій квантових точок CdTe виявлено, що лише при використанні концентрації 5 мМ відбувалось збільшення на $20,7 \pm 3,5$ % мертвих клітин та зменшення загальної концентрації ендотеліоцитів до $3,6 \pm 0,04 \times 10^4$ клітин/мл проти контролю $4,7 \pm 0,02 \times 10^4$ клітин/мл, що вказує не лише на цитотоксичну дію нанокристалічного CdTe в даній концентрації, а й на цитостатичний (антипроліферативний) ефект квантових точок CdTe по відношенню до ендотеліальних клітин миші в іморталізованій культурі.

Раніше також було продемонстровано токсичний ефект на клітини ендотелію квантових точок CdTe, однак синтезованих хімічним шляхом. Зокрема, в дослідженні *in vitro* з використанням ендотеліальних клітин пупкової вени людини (HUVECs) вивчали потенційну васкулярну ендотеліальну токсичність водорозчинних квантових точок CdTe, вкритих (ке-

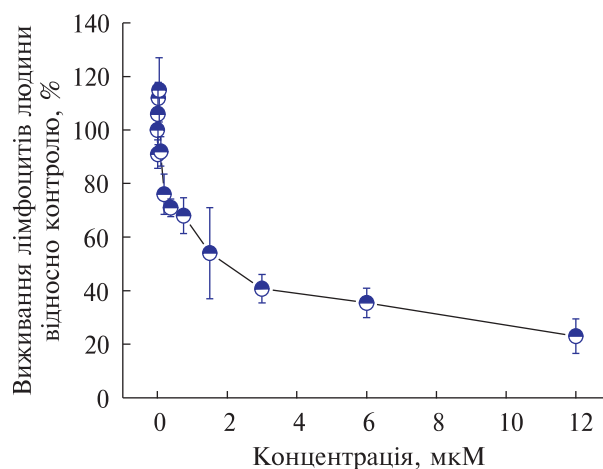


Рис. 3. Вплив квантових точок CdTe на виживаність лімфоцитів людини

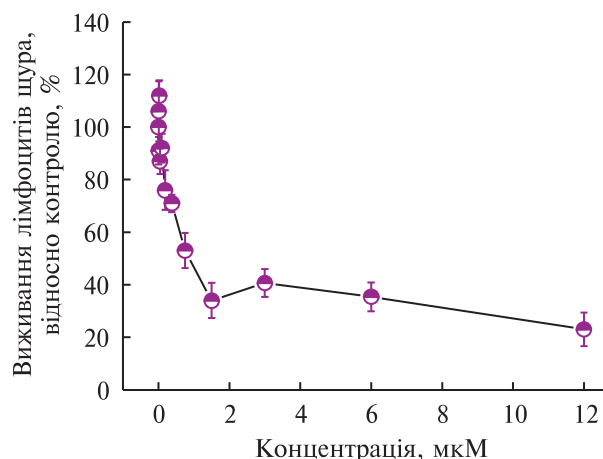


Рис. 4. Вплив квантових точок CdTe на виживаність лімфоцитів щура

пованих) меркаптосукциновою кислотою. Було встановлено, що квантові точки CdTe за використання їх в концентрації 0,1–100 мкг/мл дозозалежним чином знижували життєздатності клітин HUVECs, індукуючи у високих концентраціях значну ендотеліальну токсичність. Зокрема, було виявлено, що квантові точки телуриду кадмію в концентрації 10 мкг/мл спричиняють окислювальний стрес, фрагментацію мітохондріальної сітки та порушення мембранного потенціалу мітохондрій, а також збільшення кількості апоптичних клітин HUVECs більш, ніж на 400 %. Такі дані переконливо демонструють пряму токсичну дію хі-

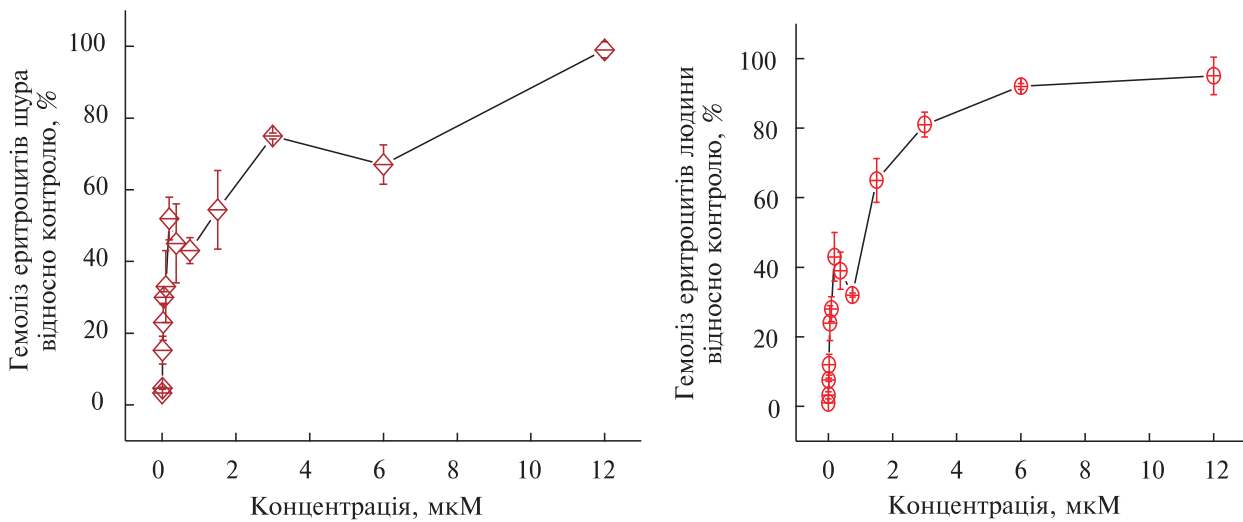


Рис. 5. Вплив квантових точок CdTe на гемоліз еритроцитів щура (а) та людини (б)

мічно синтезованих квантових точок CdTe на васкулярні ендотеліальні клітини людини, що може, як зазначають автори роботи, у разі їх практичного використання, призводити до ризику розвитку серцево-судинних захворювань (Yan et al, 2011).

Визначення впливу квантових точок CdTe на лімфоцити також проводили з використанням первинної культури лімфоцитів щура та людини. Нами було встановлено, що вплив квантових точок CdTe на лімфоцити щура та людини мав подібну залежність. Виявлено, що при розділенні популяції лімфоцитів на Т- та В-лімфоцити більша токсичність проявлялась відносно В-лімфоцитів (дані не наведено). За впливу квантових точок CdTe на лімфоцити людини спостерігається дозозалежний ефект (рис. 3), тоді як за впливу на лімфоцити щура присутній пік з незначним підвищенням активності при концентрації CdTe 3,2 мкМ, однак надалі при підвищенні концентрації квантових точок спостерігалось зниження проліферативної активності (рис. 4). Таким чином, токсичні ефекти відносно ендотеліальних клітин та лімфоцитів, визначені в МТТ-тесті та за прямим підрахунком співвідношення живих та мертвих клітин за дії синтезованих квантових точок CdTe, проявлялись в подібному діапазоні концентрацій даних наноструктур.

Одним із важливих ефектів вважається вплив різних токсикантів на гемоліз еритроцитів. Тож,

одним із етапів досліджень для різних речовин природного та синтетичного походження є визначення їх дії на виділені еритроцити периферійної крові. У наших дослідженнях було показано, що наночастинки CdTe також проявили гемолітичну активність за дії на еритроцити як людини, так і щура в подібному діапазоні концентрацій (рис. 5, а, б). Відомо, що механізм токсичності квантових точок на основі Cd зазвичай пояснюється реакцією окислення кадмієвого ядра. Ця реакція генерує активні форми кисню (АФК) та іони кадмію, які є високотоксичними для живих клітин. Квантові точки типу телуриду кадмію можуть виробляти синглетний кисень, що призводить до утворення АФК через реакцію фотоокислення. Ці продукти АФК викликають CdTe-індуковану клітинну загибель, яка супроводжується вивільненням високотоксичних вільних іонів кадмію (Nguyen et al, 2013).

Через певну цитотоксичність квантових точок, до складу яких входять іони важких металів, використання їх в клінічній практиці є дещо обмеженим. Одним із шляхів зниження цитотоксичності таких наноструктур є покриття їх поверхні, наприклад, SiO₂ (Sadaf et al, 2012). Показано, що у мишей при внутрішньовеному введенні покритих діоксидом кремнію квантових точок CdTe нефротоксичність і гепатотоксичність були зведені до мінімуму, так само як і не збільшувалась кількість еритроцитів і

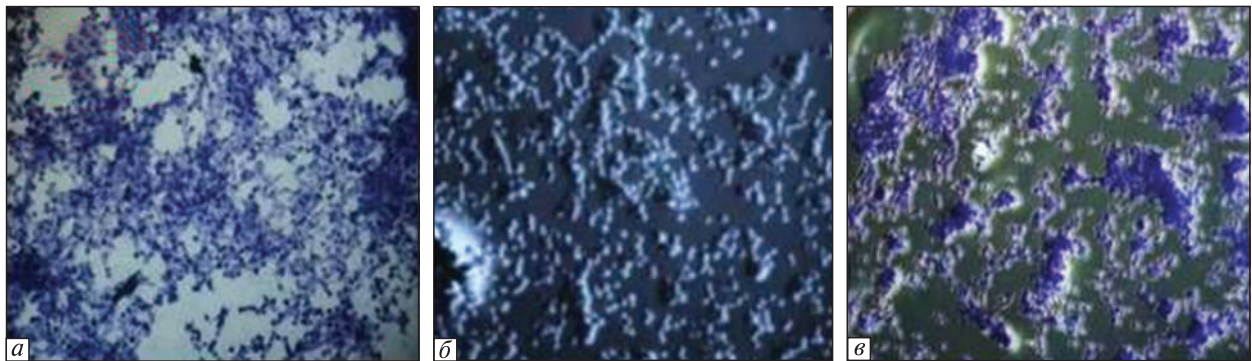


Рис. 6. Вплив квантових точок CdTe на клітини раку молочної залози людини MCF-7: *a* – контроль, *б* – 1 мкМ, *в* – 5 мкМ. $\times 100$

тромбоцитів, на відміну від лейкоцитів, що свідчить про важливість таких підходів для подальшого використання квантових точок CdTe (Sadaf et al, 2012).

Слід зазначити, що квантові точки CdTe набувають інтересу з точки зору їх використання в біомедичних дослідженнях, оскільки їм притаманні певні протипухлинні властивості, а інформація про онкогенний потенціал CdTe в прогресуванні раку є обмеженою. Тож нами було проведено оцінку цитотоксичної дії синтезованих квантових точок на клітини раку молочної залози людини (MCF-7). Перевірку на чутливість пухлинних клітин до дії квантових точок CdTe проводили в декілька етапів – в моношаровій культурі клітин раку молочної залози та за умов формування багатоклітинних пухлинних сфероїдів. Після обробки клітин CdTe в концентрації 20 мкМ спостерігали порушення клітинної мембрани та деструкцію клітин. При зменшенні концентрації наночастинок CdTe виявили зменшення кількості мертвих клітин, проте спостерігали пригнічення клітинної проліферації в порівнянні з контролем (клітини MCF-7 без додавання наночастинок CdTe). Зокрема, виявлено гальмування росту клітин за використання 5 мкМ CdTe, тоді як за дії 1 мкМ пригнічення проліферації клітин не спостерігали (рис. 6). Також нещодавно були проведені подібні дослідження з оцінки токсичної дії трьох типів квантових точок CdTe на клітинних лініях раку молочної залози людини MDA-MB468 and MCF-7 (Naderi et al, 2018), де було показано, що дані наноструктури дозозалежним чи-

ним знижують виживаність клітин та індують апоптоз. В клітинах спостерігали накопичення апоптотичних тілець, конденсацію хроматину та фрагментацію ДНК.

Було також виявлено модифікацію позаклітинного матриксу за дії досліджуваних наночастинок CdTe у порівнянні з контролем. Так, після обробки CdTe в концентрації 5 мкМ спостерігали відкріплення клітин від субстрату, що може вказувати на модифікуючий вплив наночастинок CdTe на зв'язок клітин з позаклітинним матриксом, тоді як концентрація 1 мкМ таких ефектів не спричиняла. Відомо, що нормальні клітини підтримують структуру тканини, завдяки прикріпленню одна до одної та до позаклітинного матриксу через взаємодію з молекулами клітинної адгезії, які діляться на 4 основні групи: кадгерини, інтегрини, селектини та імуноглобуліни (Janiszewska et al, 2020). Порушення в міжклітинній адгезії призводять до появи різних захворювань, зокрема раку, причиною якого є втрата міжклітинної адгезії, наслідком якої може бути колективна міграція ракових клітин (Janiszewska et al, 2020).

При дослідженні впливу біологічно синтезованих наночастинок CdTe на клітини раку товстого кишечника лінії Colo 205 (рис. 7) було виявлено, що обробка 5 мкМ CdTe призводить до порушення клітинної мембрани цих клітин та значно знижує їх виживаність. Раніше лише досліджували можливість використання квантових точок CdTe, кон'югованих з антитілом ND-1, для маркування клітин колоректального раку CCL187, приділивши більше

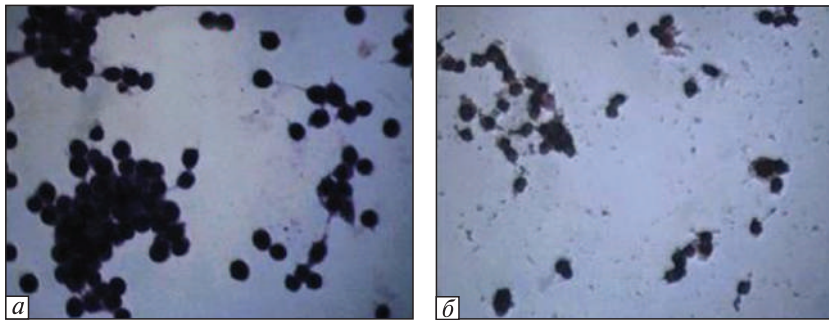


Рис. 7. Вплив квантових точок CdTe на клітини раку товстого кишечника лінії Colo 205: а – 1 мкМ, б – 5 мкМ. $\times 200$

уваги методам функціоналізації цих наноструктур, їх біологічній сумісності, флуоресцентним характеристикам, зокрема оптичній стабільності (Yu et al, 2012), а не цитотоксичному впливу. Щодо вивчення токсичного впливу цих наночастинок з використанням ракових клітин, то нещодавно було з'ясовно, що нанорозмірний кадмій телурид (у концентрації 1–25 мкг/мл) викликає пошкодження ДНК та індукує апоптоз або некроз в клітинах гепатокарциноми людини (HuH-7) (Katubi et al, 2019). Авторами роботи було виявлено високу цитотоксичність при використанні наночастинок CdTe в концентрації 25 мг/мл, зокрема за обробки клітин цією концентрацією через 48 год показник цитотоксичності CdTe досягав 62 %. Також обробка квантовими точками CdTe викликала внутрішньоклітинну генерацію АФК, деполаризацію мітохондрій, а при більш високих концентраціях індукувала апоптичну загибель клітин (Katubi et al, 2019).

Нещодавно було опубліковано дослідження по вивченню онкогенного потенціалу квантових точок CdTe на профілі експресії генів ракових клітин Chang (Aldughaim et al, 2021). Було встановлено, що зміна профілів експресії генів мала дозозалежний характер. Зміни транскрипційних профілів декількох генів, пов'язаних певним чином з онкогенезом, відбувались безпосередньо внаслідок дії CdTe. Також було виявлено, що квантові точки CdTe запускали функціональні шляхи, які автори пов'язують з генною експресією, клітинною проліферацією, міграцією, адгезією, прогресією клітинного циклу, передачею сигналу та метаболізмом. Отримані результати є

вкрай важливими для проведення подальших досліджень *in vivo* з використанням цих наночастинок по онкогенній трансформації або прогресуванню раку (Aldughaim et al, 2021).

Отже, всі ці дані, як і результати наших досліджень, є вкрай важливими для розуміння механізмів токсичності квантових точок CdTe, синтезованих різними шляхами, а також потребують враховування для майбутнього безпечного використання та маніпуляцій з цими наноструктурами, щоб зробити їх ефективним і надійними інструментами в біомедичних дослідженнях та наномедицині.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Дослідження було виконано за рахунок коштів Державного фонду фундаментальних досліджень та Національної академії наук України.

«GREEN» SYNTHESIS OF CdTe QUANTUM DOTS AND THEIR EFFECT ON HUMAN AND ANIMAL CELLS

L. Garmanchuk, M. Borova, O. Kapush,
V. Dzhagan, M. Valakh, Y. Blume, A. Yemets

Educational and Scientific Centre «Institute of Biology and Medicine», Taras Shevchenko National University of Kyiv, Acad. Glushkov Avenue, 2, Kyiv, 03022, Ukraine

V. Lashkaryov Institute of Semiconductors Physics, National Academy of Sciences of Ukraine, Nauki Avenue 41, Kyiv 03028, Ukraine
Institute of Food Biotechnology and Genomics,

National Academy of Sciences of Ukraine,
Baidy-Vyshnevetskyi str., 2a, Kyiv, 04123, Ukraine
E-mail: yemets.alla@nas.gov.ua

Since the nanoscale combined with luminescent properties and promising applications in various fields of optoelectronics and biomedicine leads to a growing interest in studying the features of cadmium telluride quantum dots, we have developed a method for the «green» synthesis of CdTe quantum dots using the mycelium culture of *Pleurotus ostreatus* as a biological matrix. The study of their physical and chemical characteristics revealed that the synthesized CdTe quantum dots have a predominantly spherical morphology and a size of 3–8 nm, a crystal structure, and a maximum luminescence in the range of 340–370 nm. When studying their effects on various types of mammalian cells, it was found that CdTe quantum dots have a dose-dependent effects on mouse endothelial cells, erythrocytes, human and rat T and B lymphocytes, colon cancer cells (Colo 205) and human breast cancer cells (MCF-7). In particular, we observed inhibition of endothelial cell proliferation and an increase in dead cells, indicating the cytotoxic effect of nanocrystalline CdTe and its antiproliferative effect on endothelial cells. CdTe quantum dots at a concentration of 5 μM exhibited hemolytic activity when exposed to erythrocytes, affected adhesive contacts and survival of cancer cells. At the same time, human breast cancer cells (MCF-7) were more sensitive to their action. The data obtained are extremely important for understanding the mechanisms of toxicity of CdTe quantum dots for their further use in biological and biomedical research.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Aldughaim MS, Al-Anazi MR, Bohol MF, Colak D, Alotheid H, Wakil SM, Hagos ST, Ali D, Alarifi S, Rout S, Alkahtani S, Al-Ahdal MN, Al-Qahtani AA (2021) Gene expression and transcriptome profiling of changes in a cancer cell line post-exposure to cadmium telluride quantum dots: possible implications in oncogenesis. *Dose Response* 19(2): 15593258211019880. <https://doi.org/10.1177/15593258211019880>.
- Aslan K, Geddes CD (2008) New tools for rapid clinical and bioagent diagnostics: micro waves and plasmonic nanostructures. *Analyst* 133:1469–1480. <https://doi.org/10.1039/b808292h>.
- Badilli U, Mollarasouli F, Bakirhan NK, Ozkan Y, Ozkan SA (2020) Role of quantum dots in pharmaceutical and biomedical analysis, and its application in drug delivery. *Trends Anal Chem*, 131:116013. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116013>.
- Bao H, Na H, Yang Y, Zhao D (2010a) Biosynthesis of biocompatible cadmium telluride quantum dots using yeast cells. *Nano Res* 3:481–489. <https://doi.org/10.1007/s12274-010-0008-6>.
- Bao H, Lu Z, Cui X, Qiao Y, Guo J, Anderson JM, Li CM (2010b) Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots. *Acta Biomaterialia* 6:3534–3541. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.030>.
- Blume Y, Yemets A, Sheremet Y, Nyporko A, Sulimenko V, Sulimenko T, Draber P (2010) Exposure of beta-tubulin regions defined by antibodies on a *Arabidopsis thaliana* microtubule protofilament model and in the cells. *BMC Plant Biol* 10:29. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-29>.
- Blume YB, Krasylenko YA, Demchuk OM, Yemets AI (2013) Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. *Front Plant Sci* 4:530. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00530>.
- Borovaya MN, Burlaka OM, Yemets AI, Blume YaB (2015a) Biosynthesis of quantum dots and their potential applications in biology and biomedicine. In: *Nanoplasmonics, Nano-Optics, Nanocomposites, and Surface Studies* (Eds. Fesenko O., Yatsenko L.), Springer Int. Publ. Switzerland, 167:339–362. https://doi.org/10.1007/978-3-319-18543-9_24.
- Borovaya MN, Pirko YV, Krupodorova TA, Naumenko AP, Blume YaB, Yemets AI (2015b) Biosynthesis of cadmium sulfide quantum dots using *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. *Biotech Biotechn Equipment* 29(6):1156–1163. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1064264>.
- Cao Y (2018) The toxicity of nanoparticles to human endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 1048:59–69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72041-8_4.
- Chang Y, Cheng X, Zhang J, Yu D (2019) Highly stable CdTe quantum dots hosted in gypsum via a flocculation-precipitation method. *J Mater Chem C*, 7:12336–12342. <https://doi.org/10.1039/C9TC04412D>.
- Chen N, He Y, Su Y, Li X, Huang Q, Wang H, Zhang X, Tai R, Fan C (2012) The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials* 33:1238–1244. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.070>.
- de la Harpe KM, Kondiah PPD, Choonara YE, Marimuthu T, du Toit LC, Pillay V (2019) The hemocompatibility of nanoparticles: a review of cell-nanoparticle interactions and hemostasis. *Cells* 8(10):1209. <https://doi.org/10.3390/cells8101209>.
- Fan Z, Dongmei Y, Haizhu S, Hao Z (2014) Cadmium-based quantum dots: preparation, surface modification, and applications. *J Nanosci Nanotechnol* 14(2):1409–1424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8751>.
- Fatima I, Rahdar A, Sargazi S, Barani M, Hassanisaadi

- M, Thakur VK (2021) Quantum dots: synthesis, antibody conjugation, and HER2-receptor targeting for breast cancer therapy. *J Funct Biomater* 12:75. <https://doi.org/10.3390/jfb12040075>.
- Garmanchuk LV, Borovaya MN, Nehelia AO, Inomistova M, Khranovska NM, Tolstanova GM, Blume YaB, Yemets AI (2019) CdS quantum dots obtained by «green» synthesis: comparative analysis of toxicity and effects on the proliferative and adhesive activity of human cells. *Cytol Genet* 53(2):132–142. <https://doi.org/10.3103/S0095452719020026>.
- Gil HM, Price TW, Chelani K, Bouillard JG, Calaminus SD, Stasiuk GJ (2021). NIR-quantum dots in biomedical imaging and their future. *IScience* 24 (3):102189. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102189>.
- Green M, Haigh SJ, Lewis EA, Sandiford L, Burkitt-Gray M, Fleck R, Vizcay-Barrena G, Jensen L, Mirzai H, Curry RJ, Dailey L-A (2016) The biosynthesis of infrared-emitting quantum dots in *Allium fistulosum*. *Sci Reports* 6:20480. <https://doi.org/10.1038/srep20480>.
- Jan SN, Somanna P, Patil AB (2022) Application of quantum dots in drug delivery. *Nanosci Nanotech Asia* 12(1):e070921191305 <https://doi.org/10.2174/210681211666210211092823>.
- Janiszewska M, Primi M, Izard T (2020) Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem* 295(8):2495–2505. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.007759>.
- Jha S, Mathur P, Ramteke S, Jain NK (2018) Pharmaceutical potential of quantum dots. *Artific Cells Nanomed Biotechnol* 46:(Sup1):57–65. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1411932>.
- Jigyasu AK, Siddiqui S, Jafri A, Arshad M, Lohani M, Khan IA (2020). Biological synthesis of CdTe quantum dots and their anti-proliferative assessment against prostate cancer cell line. *J Nanosci Nanotechnol* 20(6):3398–3403. <https://doi.org/10.1166/jnn.2020.17316>.
- Kadim AM (2019) Applications of cadmium telluride (CdTe) in nanotechnology. in: *nanomaterials – toxicity, human health and environment* (Eds. Clichici S, Filip A, do Nascimento GM). Intech, p. 1–11. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85506>.
- Kairdolf BA, Smith AM, Stokes TH, Wang MD, Young AN, Nie S (2013) Semiconductor quantum dots for bioimaging and budiagnostic applications. *Ann Rev Anal Chem* 6(1):143. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-060908-155136>.
- Kapush OA, Trishchuk LI, Tomashik VN, Tomashik ZF (2014) Effect of thioglycolic acid on the stability and photoluminescence properties of colloidal solutions of CdTe nanocrystals. *Inorg Mater* (50):13–18. <https://doi.org/10.1134/S0020168514010105>.
- Katubi KM, Alzahrani FM, Ali D, Alarif S (2019) Dose- and duration-dependent cytotoxicity and genotoxicity in human hepato carcinoma cells due to CdTe QDs exposure. *Human Exp Toxicol* 38(8): 914–926. <https://doi.org/10.1177/0960327119843578>.
- Kumar P (2022) Semiconductor (CdSe and CdTe) quantum dot: Synthesis, properties and applications. *Materials Today: Proc* 51(6):900–904. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.06.281>.
- Liu N, Tang M (2020) Toxicity of different types of quantum dots to mammalian cells *in vitro*: an update review. *J Hazard Mater* 399:122606. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122606>.
- Matea CT, Mocan T, Tabaran F, Pop T, Mosteanu O, Puia C, Iancu C, Mocan L (2017) Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *Int J Nanomed* 12:5421–5431. <https://doi.org/10.2147/IJN.S138624>.
- Matea CT, Mocan T, Tabaran F, Pop T, Mosteanu O, Puia C, Iancu C, Mocan L (2017) Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *Int J Nanomed* 12:5421–5431. <https://doi.org/10.2147/IJN.S138624>.
- Naderi S, Zare H, Taghavinia N, Irajizad A, Aghaei M, Panjehpour M (2018) Cadmium telluride quantum dots induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Toxicol Ind Health* 34:339–352. <https://doi.org/10.1177/0748233718763517>.
- Nel A, Xia T, Madler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311:622–627. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>.
- Nguyen KC, Seligy VL, Tayabali AF (2013) Cadmium telluride quantum dot nanoparticle cytotoxicity and effects on model immune responses to *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanotoxicol* 7:202–211. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.648667>.
- Osovsky R, Kloper V, Kolny-Olesiak J, Sashchiuk A, Lifshitz E (2007) Optical properties of CdTe nanocrystal quantum dots, grown in the presence of Cd nanoparticles. *J Phys Chem C* 111:10841–10847. <https://doi.org/10.1021/jp071979e>.
- Pei J, Zhu H, Wang X, Zhang H, Yang X (2012) Synthesis of cysteamine-coated CdTe quantum dots and its application in mercury (II) detection. *Anal Chim Acta* 757:63–68. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.037>.
- Ruzycka-Ayoush M, Kowalik P, Kowalczyk A, Bujak P, Nowicka AM, Wojewodzka M, Kruszewski M, Grudzinski IP (2021) Quantum dots as targeted doxorubicin drug delivery nanosystems in human lung cancer cells. *Cancer Nano* 12:8. <https://doi.org/10.1186/s12645-021-00077-9>.
- Sadaf A, Zeshan B, Wang Z, Cui Y et al (2012) Toxicity evaluation of hydrophilic CdTe quantum dots

- and CdTe/SiO₂ nanoparticles in mice. *J Nanosci Nanotechnol* 12(11):8287–8292. <https://doi.org/10.1166/jnn.2012.6667>.
- Sahoo SL, Liu C-H, Kumari M, Wu W-C, Wang C-C (2019) Biocompatible quantum dot-antibody conjugate for cell imaging, targeting and fluorometric immunoassay: crosslinking, characterization and applications. *RSC Adv* 9:32791–32803. <https://doi.org/10.1039/c9ra07352c>.
- Syed A, Ahmad A (2013) Extracellular biosynthesis of CdTe quantum dots by the fungus *Fusarium oxysporum* and their anti-bacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Mol Biomol Spectroscopy* 106:41–47. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.01.002>
- Talpin DV, Haubold S, Rogach AL, Kornowski A, Haase M, Weller H (2001) A novel organometallic synthesis of highly luminescent CdTe nanocrystals. *J Phys Chem B* 105:2260–2263. <https://doi.org/10.1021/jp003177o>.
- Yan M, Zhang Y, Xu K, Fu T, Qin H, Zheng X (2011) An *in vitro* study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. *Toxicol* 282:94–103. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.015>.
- Yemets A, Stelmakh O, Blume YB (2008) Effects of the herbicide isopropyl-*N*-phenyl carbamate on microtubules and MTOCs in lines of *Nicotiana sylvestris* resistant and sensitive to its action. *Cell Biol Int* 32(6):623–629. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.01.012>.
- Yu Y, Xu L, Chen J, Gao H, Wang S, Fang J, Xu S (2012) Hydrothermal synthesis of GSH–TGA capped CdTe quantum dots and their application in labeling colorectal cancer cells. *Colloids Surface B: Biointerfaces* 95:247–253. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.03.011>.
- Zhang Y, Kaji N, Tokeshi M, Baba Y (2007) Nanobiotechnology: quantum dots in bioimaging, *Exp Rev Proteomics* 4(4):565–572. <https://doi.org/10.1586/14789450.4.4.565>.
- Zhao MX, Zhu BJ (2016) The research and applications of quantum dots as nano-carriers for targeted drug delivery and cancer therapy. *Nanoscale Res Lett* 11:207. <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1394-9>.

Надійшла в редакцію 01.02.23

Після доопрацювання 16.02.23

Прийнята до друку 18.05.23