

## РАЗМЕРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И МЕХАНИЗМЫ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕЛЕНА, КОБАЛЬТА И СЕРЕБРА НА МИТОХОНДРИИ ПЕЧЕНИ КРЫС

© 2025 г. С.С. Ануфрик\*, А.И. Савко\*, С.Н. Анучин\*, #, Т.А. Коваленя\*, Т.В. Ильич\*, Т.К. Крупская\*, Е.А. Лапшина\*, И.Б. Заводник\*

\*Гродненский государственный университет имени Янки Купалы,  
бульв. Ленинского комсомола, 5, Гродно, 230009, Республика Беларусь

#E-mail: anuchin\_sn@grsu.by

Поступила в редакцию 15.11.2023 г.

После доработки 02.12.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2024 г.

Наноразмерные материалы широко используются в биомедицинских нанотехнологиях, однако механизмы токсических эффектов нанокластеров металлов и неметаллов остаются невыясненными. Цель настоящей работы – оценить размерные характеристики и механизмы токсического действия наночастиц серебра, селена и кобальта на уровне изолированных митохондрий. Методом лазерной аблации получены наночастицы серебра (округлой формы, ~10–20 нм и ~50 нм), кобальта (кубической и призматической формы, ~100–200 нм) и селена (сферические, ~20–30 нм и 135–180 нм), отличающиеся спектральными характеристиками и способные формировать конгломераты. Наночастицы серебра, кобальта, селена (0.1–10 мкг/мл) эффективно ингибиравали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс, нарушая сопряжение окисления и фосфорилирования, что сопровождалось падением потенциала митохондриальных мембран. Разобщающий эффект наночастиц может быть связан с переносом электронов от электрон-транспортной цепи митохондрий на положительно заряженную поверхность наночастиц и зависит от размеров и материала наночастиц.

**Ключевые слова:** наночастицы, токсическое действие, митохондриальные мембранны, ингибирование, респираторная активность.

**DOI:** 10.31857/S0006302925010134, **EDN:** LVAWQC

Наноразмерные материалы широко используются в биомедицинских нанотехнологиях [1], однако потенциальные угрозы их распространения в окружающей среде, в том числе токсические эффекты нанокластеров металлов и неметаллов, остаются невыясненными. Присутствие среди поллютантов наноразмерных загрязняющих веществ (или переход загрязнителей в наноразмерные формы) резко повышает поражающее действие последних, существенно изменяет механизмы их повреждающего воздействия. Выраженные фармакологические и токсические эффекты наноразмерных материалов связаны с тем, что наночастицы переносятся через гематоэнцефалический барьер и клеточные мембранны, аккумулируются в митохондриях, многие наноматериалы обладают окислительно-восстановительной активностью [2]. Выведение подобного рода частиц из организма затруднено. Наноразмерные частицы благородных металлов

(как и неметаллов) широко используются в различных областях науки, техники, медицины, включая катализ и фотонику. Среди различных металлов наночастицы серебра и золота представляют особый интерес из-за антимикробных свойств и локализованного поверхностного плазмонного резонанса, эти свойства обеспечивают им широкое применение в качестве противомикробных препаратов широкого спектра действия, химических/биологических сенсоров, биоматериалов и биомаркеров, перспективных невирусных средств доставки генетического материала в клетки и ткани [3]. Использование наноразмерных (1–100 нм) фармакологических агентов или векторов доставки лекарств к клеткам и клеточным органеллам представляет новую, быстро развивающуюся область современной медицины (наномедицина) [4, 5].

В настоящее время разработаны эффективные методы синтеза, контроля морфологии, модификации наночастиц. В качестве одного из наиболее перспективных методов получения наночастиц

*Сокращение:* ACM – атомно-силовая микроскопия.

металлов рассматривается синтез методом лазерной абляции объемных металлических материалов в растворах [6]. Металлы: золото, серебро, диоксид титана, – широко используются для получения однородных гомогенных наночастиц малого размера (3–30 нм) [7], которые, благодаря высокому соотношению площади поверхности и объема, приобретают уникальные биологические, электромеханические, оптические свойства, каталитическую и редокс-активности и т.д. [8]. В литературе встречаются противоречивые результаты, описывающие токсические, биохимические, физиологические (в том числе провоспалительные) эффекты наночастиц. Предполагают, что наночастицы металлов способны освобождать соответствующие ионы, что и определяет цитотоксичность [9]. Согласно современным представлениям, положительно заряженные наночастицы сорбируются отрицательно заряженными фосфолипидами клеточной мембранны с образованием эндосом, которые при слиянии с лизосомами формируют эндолизосомы. В результате разрыва эндолизосомальной мембраны наночастицы выбрасываются в цитоплазму и могут поступать в митохондрии [10].

Клеточные и митохондриальные мембранные барьеры потенциально могут быть преодолены за счет создания митохондриотропных переносчиков в виде наночастиц, способных избирательно транспортировать молекулы лекарств в митохондрии [7]. Ранее нами было показано, что минимальная бактерицидная в отношении ряда патогенных штаммов грамположительных и грамотрицательных поликонъюгатоустойчивых микроорганизмов концентрация наночастиц серебра и наночастиц оксида цинка, полученных методом лазерной абляции, начинается от 31.25 мкг/мл и от 250 мкг/мл соответственно [11].

В то же время остро стоит вопрос выяснения механизмов токсического действия и преодоления цитотоксичности наночастиц металлов и неметаллов. Для оценки активности наноразмерных токсических агентов из огромного числа металлов и неметаллов, используемых для получения наночастиц для биомедицинских целей, мы выбрали нанокластеры благородного металла серебра и микроэлементов кобальта (металл) и селена (неметалл), обладающих высокой биологической активностью и широко исследуемых. Наночастицы, полученные на основе биологически значимого микроэлемента селена, обладают высокой проводимостью, каталитической активностью, уникальными пьезоэлектрическими, термоэлектрическими, оптическими свойствами, участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, оказывают плейотропный эффект на клетки и ткани, включая антиоксидантное, цитопротекторное, противораковое действие, индуцируют апоптоз, подавляют образование активных форм кислоро-

да, но также активируют биогенез митохондрий и, как следствие, повышают уровень внутриклеточного АТФ, регулируют гомеостаз  $\text{Ca}^{2+}$ , активируют сигнальную систему  $\text{Ca}^{2+}$ . Наночастицы селена легко проникают через гематоэнцефалический барьер [12]. Подобным образом, ионы кобальта играют важную роль в метаболических процессах. Наночастицы кобальта, являющиеся магнетиками, используются как системы доставки лекарств, контрастирующие агенты, биосенсоры, противораковые агенты [13]. Наночастицы серебра имеют широкий антибактериальный, антимикотический и противовирусный спектр действия, включены в состав ряда противораковых препаратов [14].

Мы оценили эффекты наночастиц на респираторную активность и мембранный потенциал изолированных митохондрий печени крыс. Митохондрии, динамичные и пластичные клеточные органеллы, помимо синтеза АТФ, регуляции кальциевого гомеостаза, интеграции метаболических и сигнальных путей, генерации активных форм кислорода, участвуют в регуляции широкого спектра разнообразных клеточных функций. Митохондрии представляют многообещающую терапевтическую мишень действия многих лекарственных средств, достаточно автономную субклеточную систему, которую можно использовать для обнаружения, профилактики и лечения различных заболеваний человека, таких как рак, нейродегенеративные заболевания, ишемико-реперфузионное повреждение, диабет, ожирение. В настоящее время митохондриальная дисфункция рассматривается как один из основных механизмов токсичности наноматериалов [15].

Цель настоящей работы – исследование размерных характеристик, молекулярных и мембранных механизмов токсического действия наночастиц серебра, селена и кобальта на субклеточном уровне.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы и материалы.** В работе использовали сахарозу, трис(гидроксиметил)аминометан (трис-HCl), наргенин, наргингин, катехин, этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N,N-тетрауксусную кислоту (ЭГТА), аденоzinификафат, сукцинат натрия, калия хлорид, кальция хлорид, рутений красный, циклоспорин А, карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразон (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Германия), чистые металлы и неметаллы (мерные слитки серебра Национального Банка Республики Беларусь (99.9% Ag), куб из цельного металла кобальта 1.0 × 1.0 × 1.0 см (99.9% Co), отливку металлического селена ( $\gamma$ -Se 99.9 %, квалификации «осч»), калий фосфорнокислый однозамещенный, сульфат магния, метanol, этанол

и ацетон высшей степени чистоты (ООО «АО РЕАХИМ», Москва, Россия). Все растворы были приготовлены на воде, очищенной в системе Milli-Q Direct (Merck KGaA, Германия).

**Синтез наночастиц.** Используемые наночастицы серебра, кобальта, селена были синтезированы методом лазерной абляции в жидкости по предложенной ранее методике [16, 17]. Излучение твердотельного лазера Lotis LS-2147 (СП «ЛОТИС ТИИ», Беларусь) на основе алюмо-иттриевого граната, легированного ионами неодима ( $\text{Nd}^{3+}$ ), фокусируется на поверхность облучаемой мишени, которая помещена в кювету с дистиллированной водой. Сфокусированный лазерный пучок имел диаметр 3.0 мм при следующих параметрах: энергия генерации в импульсе 100 мДж, длительность лазерного импульса по полу涓高оте  $t = 18$  нс, длина волны излучения  $\lambda = 1064$  нм. В качестве мишней использовали Ag, Co, Se. Степень чистоты изучаемых металлов контролировали с помощью рентгенофлуоресцентного анализатора ElvaX CEP-01 (ООО «Элватех», Украина) [18].

Лазерную абляцию мишени в дистиллированной воде осуществляли при частоте следования импульсов 10 Гц в течение 20 мин. В ходе синтеза цвет коллоидных растворов получаемых наночастиц приобретал различную окраску, что косвенно подтверждало формирование наночастиц.

Оптические свойства синтезированных наночастиц регистрировали с помощью UV-VIS спектрофотометра V-650 (Jasco International Co., Ltd., Япония).

Размерные параметры и форму наночастиц, осажденных из коллоидных растворов, оценивали на сканирующем зондовом атомно-силовом микроскопе NT-206 (ОДО «Микротестмашины», Беларусь), что позволило в нанометровом размерном диапазоне получить информацию о материале и его поверхности без разрушения или какой-либо модификации, не требуя дополнительного нанесения токопроводящего слоя.

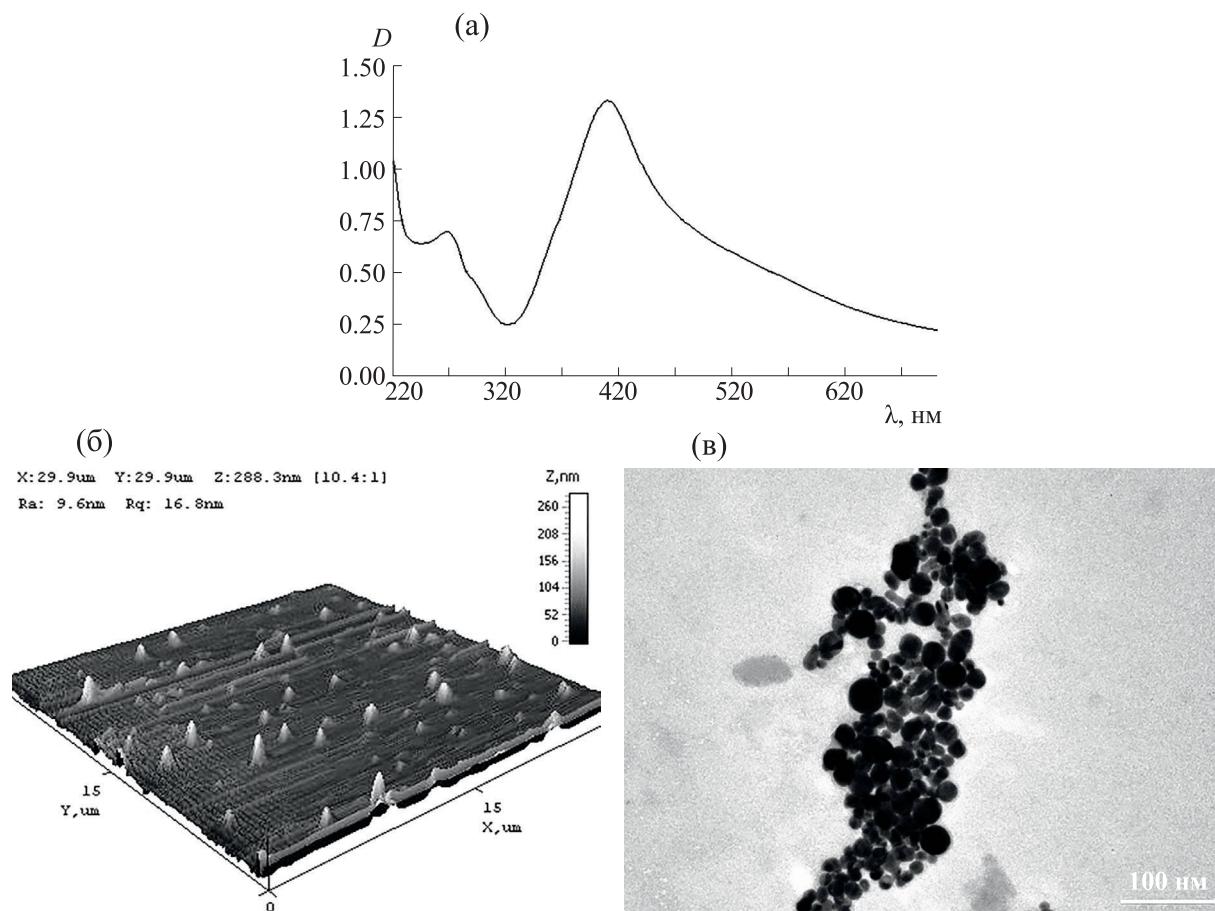
Электронно-микроскопическое изучение наночастиц осуществляли с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL Ltd., Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ, с вмонтированной цифровой камерой MegaView III (Olympus, Германия). Для анализа изображений использовали программу iTEM (Olympus, Германия). Для электронно-микроскопического анализа наночастицы сорбировали на предварительно покрытую формваром (Formvar Resin for Coating Grids for TEM, SPI Supplies, США) сеточку для просвечивающей электронной микроскопии.

**Выделение митохондрий.** В экспериментах использовали клинически здоровых (Санитарно-гигиеническое заключение № 33-48/500 от

28.09.2017 г., Центр гигиены и эпидемиологии Первомайского района, г. Минск) аутбредных крыс линии Wistar массой 120–140 г, разведения вивария Института физиологии НАН Беларусь. Каждая экспериментальная группа включала 5–7 животных. Митохондрии изолировали методом дифференциального центрифугирования [19]. Печень крыс-самцов быстро извлекали на холода ( $4^{\circ}\text{C}$ ), осушали, взвешивали и гомогенизировали в гомогенизаторе (тефлон–стекло) (600 об/мин, 1 мин) в охлажденной среде выделения, содержащей 0.25 М сахарозы, 0.02 М трис-HCl и 0.001 М ЭГТА, pH 7.2, при  $4^{\circ}\text{C}$ . Использовали гомогенизатор HG-15A (Daihan Scientific, КНР). Ядерную фракцию удаляли центрифугированием (600 g, 10 мин,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Для осаждения митохондрий полученный супернатант центрифугировали (8500 g, 10 мин,  $4^{\circ}\text{C}$ ) (центрифуга Z 32 HK, Hermle Labortechnik GmbH, Германия), митохондриальный осадок дважды промывали в среде выделения при  $4^{\circ}\text{C}$  и ресуспендировали в среде, не содержащей ЭГТА (0.15 М KCl, 0.02 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4, концентрация белка составляла 40–45 мг/мл).

**Респираторная активность и мембранный потенциал митохондрий.** Респираторную активность изолированных митохондрий (0.5 мг белка/мл) в отсутствие и в присутствии наночастиц регистрировали при  $25^{\circ}\text{C}$ , используя электрод Кларка и термостатируемую ячейку (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания) при постоянном легком перемешивании в не содержащей ЭГТА среде следующего состава: 0.125 М KCl, 0.05 М сахарозы, 0.01 М трис-HCl, 0.025 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.005 М  $\text{MgSO}_4$ , pH 7.2. Измеряли скорости потребления кислорода в состоянии 2 ( $V_2$ ) в присутствии субстрата (5 мМ сукцината) и в АДФ-стимулированном (200 мКМ) состоянии 3 ( $V_3$ ). Рассчитывали коэффициент акцепторного контроля (ACR), равный соотношению скоростей потребления кислорода ( $V_3/V_2$ ) в состояниях 3 и 2, и коэффициент фосфорилирования (отношение АДФ/О).

Потенциал митохондриальной мембраны измеряли спектрофлуориметрически, используя положительно заряженный липофильный флуоресцентный зонд сафранин O [20] в среде, содержащей 0.025 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.005 М  $\text{MgSO}_4$ , 0.125 М KCl, 0.05 М сахарозы, 0.01 М трис-HCl, pH 7.5 при  $27^{\circ}\text{C}$ . Концентрация белка в пробе – 0.5 мг/мл. Потенциал-зависимое накопление зонда в митохондриях приводит к тушению флуоресценции. Флуоресценцию сафранина O возбуждали при длине волны  $\lambda_{\text{ex}} = 495$  нм и регистрировали при длине волны  $\lambda_{\text{em}} = 586$  нм, используя спектрофлуориметр СМ 2203 (Solar, Беларусь). Среда содержала суспензию митохондрий печени крыс (0.3 мг/мл), зонд сафранин O



**Рис. 1.** Наночастицы серебра: (а) – спектр поглощения коллоидного раствора, 10 мкг/мл; (б) – снимок АСМ; (в) – электронно-микроскопическое изображение.

(8 мкМ), субстрат дыхания – сукцинат (5 мМ), в конце измерения для контроля завершенности процесса деполяризации мембран вносили известный протонофор карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразон (0.5 мкМ), разобщитель митохондриального окислительного фосфорилирования, транспортирующий протоны через внутренние мембранны митохондрий и нарушающий синтез АТФ. Значения потенциала митохондриальной мембранны (в мВ) определяли с помощью калибровочного графика, представляющего зависимость интенсивности флуоресценции сафранина О от значения потенциала, изменяющегося в зависимости от внemитохондриальной концентрации ионов калия, и рассчитанного по уравнению Нернста [21]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури и соавт. [22].

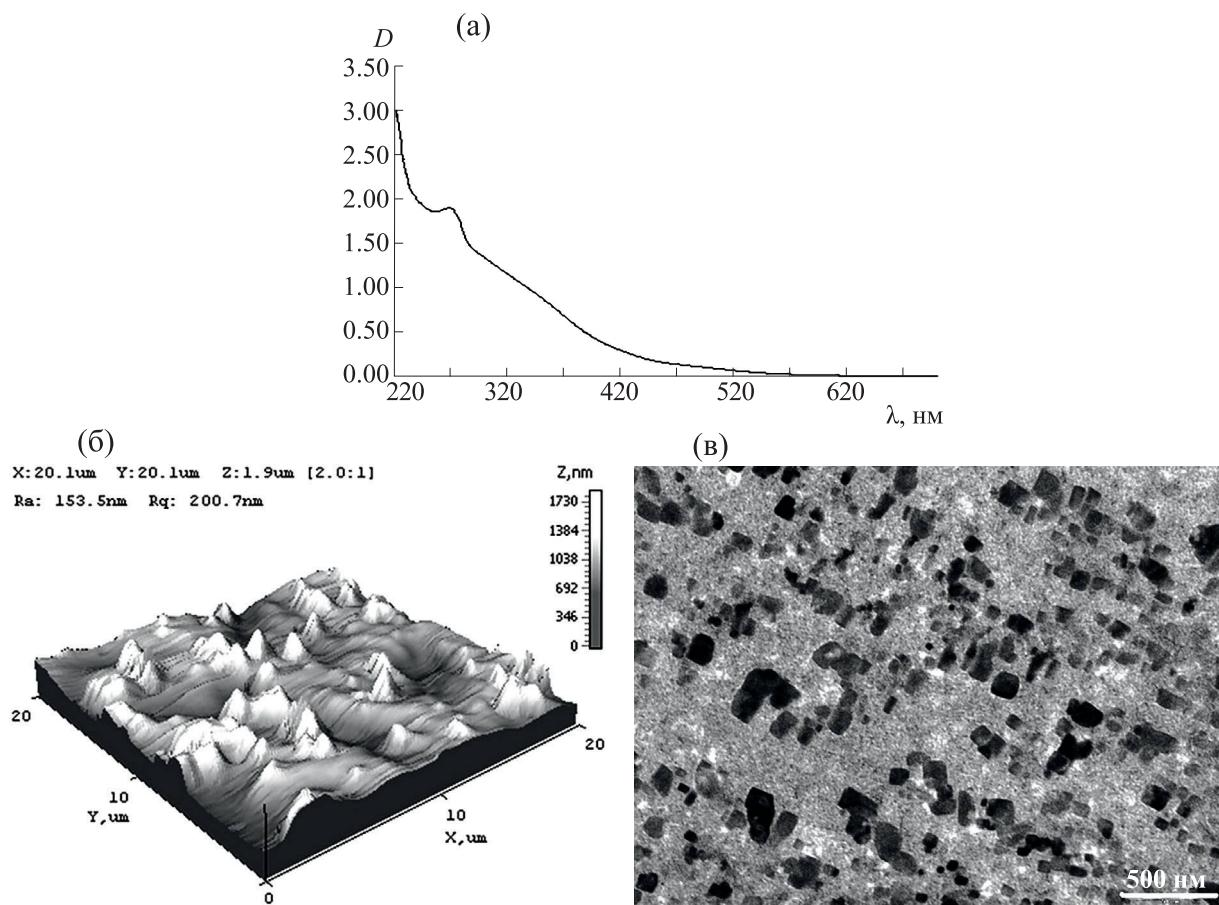
**Статистический анализ.** Проверку нормальности распределения параметров проводили, используя тест Шапиро–Уилка (Shapiro–Wilks test). Результаты представляли в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с

использованием критерия Тьюки. Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel 2013 и прикладных программ STATISTICA 10.0. Статистически значимыми принимали различия между значениями параметров в группах при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Размерные характеристики наночастиц.** На рис. 1а приведен спектр поглощения коллоидного раствора наночастиц серебра. Как видно из этого рисунка, основной максимум поглощения расположен в области 409 нм и соответствует поглощению наночастиц серебра, второй, менее интенсивный максимум, находится в области ~267 нм.

Из рис. 1б видно, что основную массу составляют мелкие наночастицы Ag пирамidalной формы с размерами ~10–20 нм. Наблюдаются также отдельные, более крупные (от 50 до 260 нм), наночастицы конической формы.



**Рис. 2.** Наночастицы кобальта: (а) – спектр поглощения коллоидного раствора, 10 мкг/мл; (б) – снимок АСМ; (в) – электронно-микроскопическое изображение.

Представленные на электронном снимке (рис. 1в) наночастицы Ag имеют окружную форму с четкими гранями и характеризуются двумя типоразмерами: мелкие ~20 нм и более крупные ~50 нм, что соответствует данным атомно-силовой микроскопии (АСМ).

Спектр поглощения коллоидного раствора кобальта (рис. 2а) содержит максимум в области ~268 нм, что соответствует, вероятно, конгломератам наночастиц. Представленная на рис. 2б морфология поверхности осажденных наноструктур кобальта имеет волнообразный вид с выделяющимися вершинами пирамидальной формы. Отдельные пирамидальные наночастицы (150–200 нм), образуют конгломераты высотой до 1.7 мкм и 3–5 мкм по основанию.

На электронно-микроскопическом изображении (рис. 2в) отчетливо видны наночастицы кубической и призматической формы с размерами от ~100–200 нм, образующие, вероятно, волнообразное покрытие на снимке АСМ (рис. 2б).

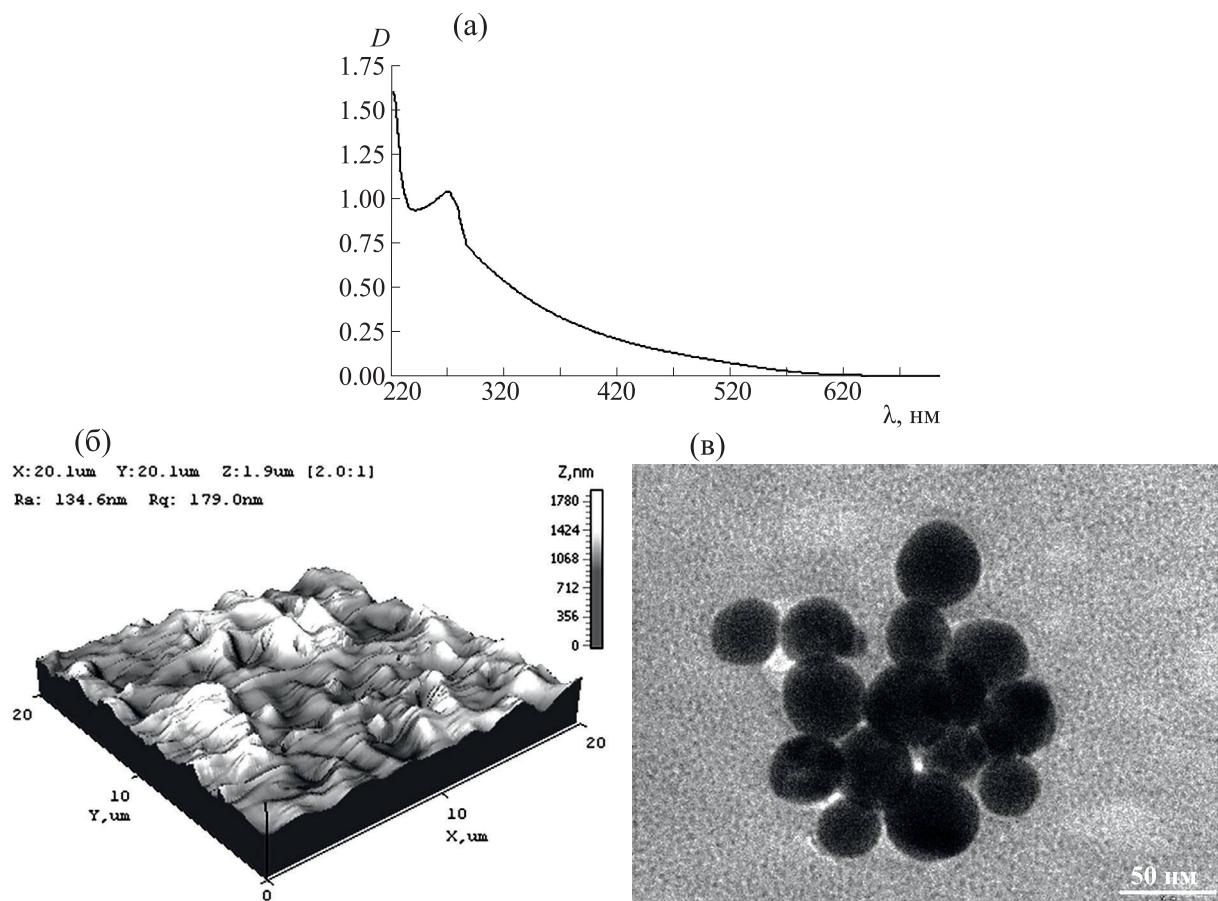
Представленный на рис. 3а спектр поглощения коллоидного раствора наночастиц селена ха-

рактеризуется максимумом в области ~268 нм, что соответствует собственному поглощению наночастиц селена. Раствор имеет оранжевый цвет.

АСМ-изображение (рис. 3б) демонстрирует неоднородное покрытие, образованное, вероятно, отдельными окружными и эллиптическими наночастицами размером 135–180 нм, собранными в конгломераты конической формы, имеющие высоту до 1.8 мкм и основание 2–5 мкм.

На рис. 3в представлен электронно-микроскопический снимок наночастиц Se. Методом электронной микроскопии продемонстрировано наличие скопления окружных и сферических наночастиц, средний размер которых составляет ~20–30 нм. Видно, что существует выраженная гетерогенность наночастиц селена по размерам, выявляемая методами АСМ и электронной микроскопии.

Таким образом, методом лазерной абляции нами получены наночастицы серебра, кобальта и селена, отличающиеся разнообразием форм и размеров, спектральными характеристиками и способные формировать конгломераты.

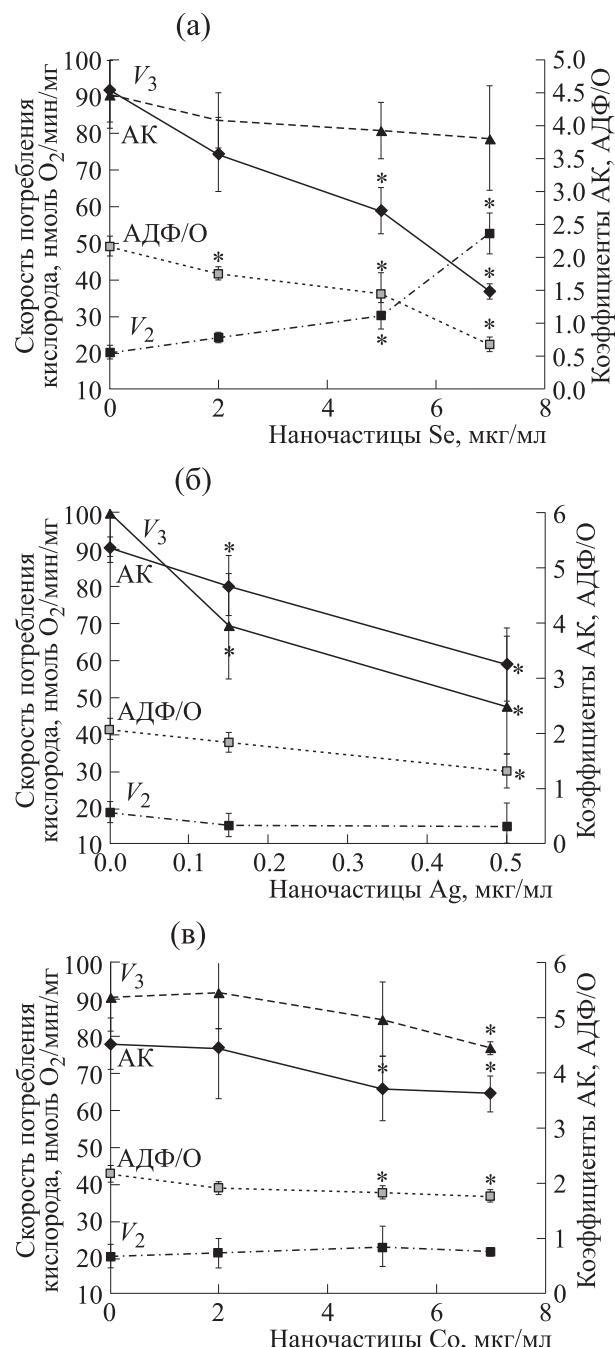


**Рис. 3.** Наночастицы селена: (а) – спектр поглощения коллоидного раствора, 10 мкг/мл; (б) – снимок АСМ; (в) – электронно-микроскопическое изображение.

**Нарушения функциональной активности митохондрий печени крыс в присутствии наночастиц.** Эффекты наночастиц, различающихся материалом и размерами, на параметры потребления кислорода изолированными митохондриями печени крыс и мембранный потенциал различались по эффективности и характеру воздействия. В наших экспериментах в среде, не содержащей ЭГТА, хелатор ионов кальция, наночастицы серебра, кобальта и селена (0.1–10 мкг/мл) эффективно ингибиравали респираторную активность изолированных митохондрий печени крыс при использовании сукцината в качестве субстрата дыхания: скорость АДФ-стимулируемого потребления кислорода  $V_3$ , коэффициент дыхательного контроля  $V_3/V_2$  и коэффициент фосфорилирования АДФ/О уменьшались, свидетельствуя о дозозависимом нарушении сопряжения окисления и фосфорилирования и уменьшении эффективности потребления кислорода митохондриями (рис. 4). Наибольший эффект на респираторную активность и мембранный потенциал митохондрий оказали наночастицы серебра (0.1–0.5 мкг/мл), характеризующиеся наименьшим из

исследуемых наночастиц размером, скорость субстрат-зависимого потребления кислорода  $V_2$  при этом не изменялась. Наночастицы неметалла селена, помимо уменьшения скорости  $V_3$ , коэффициентов  $V_3/V_2$  и фосфорилирования АДФ/О, увеличивали значение скорости  $V_2$ . Наночастицы кобальта уменьшали значения скорости  $V_3$ , коэффициентов  $V_3/V_2$  и фосфорилирования АДФ/О, не изменяя значения  $V_2$ . При этом более крупные наночастицы селена и кобальта требовали больших концентраций для проявления токсических эффектов (2–10 мкг/мл).

Вероятно, выраженная митохондриотропного разобщающего эффекта определяется рядом параметров – размерами наночастиц и материалом, поверхностным потенциалом, гидрофобностью и т.д., что будет оказывать влияние на структуру и проницаемость митохондриальной мембраны, накопление наночастиц в митохондриях, взаимодействие с компонентами электрон-транспортной цепи митохондрий.



**Рис. 4.** Респираторная активность митохондрий печени крыс в присутствии различных концентраций наночастиц серебра (а), серебра (б) и кобальта (в):  $V_2$  – скорости субстрат-зависимого дыхания;  $V_3/V_2$ , АДФ/О – коэффициенты акцепторного контроля (АК) и фосфорилирования АДФ/О (2). Состав субстрата: 5 мМ сукцината, 0.5 мг белка/мл, 0.125 М KCl, 0.05 М сахарозы, 0.01 М трис-HCl, 0.0025 М K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.005 М MgSO<sub>4</sub>, pH 7.2, 25°C.

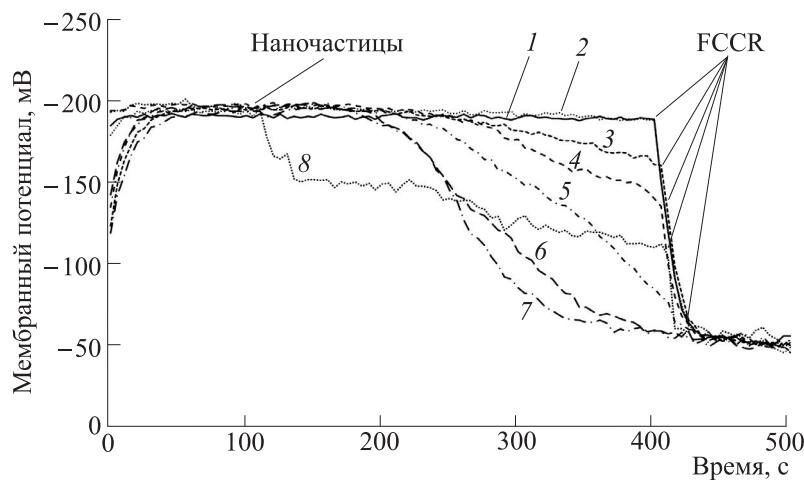
Одним из следствий нарушения наночастицами респираторной активности митохондрий и эффективности потребления кислорода будет диссипация мембранныго потенциала. Митохон-

диальный мембранный потенциал, генерируемый при работе электрон-транспортной цепи митохондрий, определяет функциональное состояние этих клеточных органелл. Используемые концентрации наночастиц в среде, не содержащей ЭГТА, дозозависимо индуцировали деполяризацию мембран митохондрий печени крыс, что регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции зонда сафранина О, поступающего в митохондрии в зависимости от потенциала. Рис. 5 представляет репрезентативные кривые стимулируемого наночастицами процесса диссипации митохондриального потенциала.

Известно, что наночастицы, в том числе наночастицы металлов, эффективно проникают через плазматическую мембрану и влияют на многочисленные внутриклеточные процессы. Захват наночастиц металлов липидным бислоем, в зависимости от размера, электростатического заряда и гидрофобности наночастицы и типа бислоя, индуцировал изменения в упаковке липидов, нарушил липид-липидные взаимодействия, уменьшал температуру фазового перехода в бислое и увеличивал текучесть мембраны. Определяющую роль при этом играют электростатические взаимодействия между отрицательно заряженной мембранный поверхностью и положительно заряженными наночастицами [23].

Недавно было показано, что наночастицы серебра (40 и 80 нм) существенно нарушали биоэнергетику изолированных митохондрий печени крыс, изменяя проницаемость митохондриальной мембраны, вызывая разобщение системы окислительного фосфорилирования [2]. Наночастицы серебра (10–50 мг/л) *in vitro* ингибиуют комплексы I, II, III и IV изолированных митохондрий мозга, скелетных мышц, сердца, печени, генерируя активные формы кислорода [24]. Таким образом, нанокластеры серебра, покрыты альбумином (размер – 2 нм), индуцируют митохондриальную дисфункцию посредством синергетического воздействия двух эффектов: 1) перехода митохондриальной мембранны в состояние высокой проницаемости путем взаимодействия с фосфолипидным бислоем (а не со специфическими белками митохондриальной поры); 2) нарушения респираторной активности митохондрий за счет образования активных форм кислорода [25].

Подобным образом наночастицы селена, специфически взаимодействуя с митохондриями, индуцировали гибель клеток HeLa, генерируя активные формы кислорода и повреждая митохондрии [26]. Недавно было высказано предположение, что механизм нейротоксичности наночастиц кобальта связан с фрагментацией митохондрий, генерацией активных форм кислорода, исчерпанием АТФ, морфологическими изменениями клеток и аутофагией [27, 28]. Более того, наноча-



**Рис. 5.** Репрезентативные кинетические кривые диссипации мембранныго потенциала в митохондриях печени крыс, регистрируемые по изменению интенсивности флуоресценции зонда сафранина О в отсутствие и в присутствии наночастиц: 1 – в отсутствие наночастиц (контроль), 2 – 7 мкг/мл наночастиц кобальта, 3 – 10 мкг/мл наночастиц кобальта, 4 – 2 мкг/мл наночастиц селена, 5 – 5 мкг/мл наночастиц селена, 6 – 7 мкг/мл наночастиц селена, 7 – 10 мкг/мл наночастиц селена, 8 – 0.3 мкг/мл наночастиц серебра. В суспензию митохондрий (0.5 мг белка/мл) в среде, содержащей 0.025 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.005 М  $\text{MgSO}_4$ , 0.125 М  $\text{KCl}$ , 0.05 М сахарозы, 0.01 М трикс- $\text{HCl}$ , рН 7.4, в присутствии 5 мМ сукцината вносили различное количество наночастиц при 27°C. Концентрация белка в пробе – 0.5 мг/см<sup>3</sup>.

стицы кобальта способны формировать нанотрубки, обеспечивающие перенос митохондрий между клетками [28].

Мы предполагаем сложный характер нарушения наночастицами функциональной активности митохондрий. Исследуемые наночастицы могут нарушать протонную проводимость внутренней митохондриальной мембраны и инициировать истечение протонов, ингибировать комплексы дыхательной цепи и АТФ-синтазу, нарушать перенос электронов по электрон-транспортной цепи митохондрий; еще один механизм может быть связан с переносом электронов от редокс-центров электрон-транспортной цепи митохондрий на положительно заряженную поверхность экзогенных наночастиц, что определяет разобщающий эффект наночастиц. Перенос электронов будет зависеть от редокс-потенциала центров, активационного барьера, расстояния между центрами, стерических факторов.

Как известно, в большинстве биохимических процессов перенос электронов представляет собой реакцию туннелирования электронов, при которой электрон переносится от одного редокс-центра до другого поэтапно, вплоть до внешнего акцептора [29], в том числе по туннельному механизму осуществляется перенос электронов между редокс-центрами электрон-транспортной цепи митохондрий, флавинами, железо-серными кластерами, гемами.

В нашем эксперименте эффекты наночастиц зависели от материала наночастиц и уменьшались по мере увеличения их размеров. Ранее было

показано, что наночастицы селена, в зависимости от размеров, различным образом воздействовали на уровень  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке и кальциевую сигнализацию, что объясняет, почему цитопротекторный потенциал наночастиц селена в зависимости от наноразмера убывает в следующем порядке: 100 нм > 400 нм > 50 нм [12]. С другой стороны известно, что более мелкие наночастицы серебра, обладающие большим соотношением площади поверхности и объема и большей скоростью ионизации, характеризуются большим токсическим эффектом [30, 31].

В одной из наших предыдущих работ было показано, что наночастицы оксида цинка, имеющие размеры ~15–18 нм, ингибируют рост бактерий при значительно более высоких концентрациях, чем наночастицы серебра, имеющие размеры ~40–60 нм [11], что указывает на сложный механизм взаимодействияnanoструктур с биообъектами, зависящий от материала и размеров наночастиц и природы биообъекта.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Все исследуемые наночастицы металлов (кобальта, серебра) и неметалла селена (0.1–10 мкг/мл) в среде, не содержащей ЭГТА, дозависимо уменьшали скорость АДФ-стимулируемого потребления кислорода  $V_3$ , коэффициент дыхательного контроля  $V_3/V_2$  и коэффициент фосфорилирования АДФ/О<sub>2</sub>, свидетельствуя о нарушении сопряжения реакций окисления и фосфорилирования и эффективности потребления кислорода, при этом наночастицы се-

ребра (0.1–1 мкг/мл) уменьшали скорость  $V_2$ , селена (2–10 мкг/мл) – увеличивали  $V_2$ , кобальта (2–10 мкг/мл) – не изменяли  $V_2$ . Ингибиование респираторной активности митохондрий в присутствии наночастиц приводит к диссипации митохондриального мембранныго потенциала. Выраженные эффекты наночастиц на функциональную активность изолированных митохондрий, зависящие от материала и наноразмеров, позволяют предположить, что митохондрии выступают мишениями повреждающего действия наночастиц.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gautam A., Singh D., and Vijayaraghwan R. Dermal exposure of nanoparticles: an understanding. *J. Cell. Tissue Res.*, **2** (1), 2703–2708 (2011).
- Teodoro J. S., Simões A. M., Duarte F. V., Rolo A. P., Murdoch R. C., Hussain S. M., and Palmeira C. M. Assessment of the toxicity of silver nanoparticles *in vitro*: a mitochondrial perspective. *Toxicol. in vitro*, **25** (3), 664–70 (2011). DOI: 10.1016/j.tiv.2011.01.004
- Natsuki J., Natsuki T., and Hashimoto Y. A review of silver nanoparticles: synthesis methods, properties and applications. *Int. J. Materials Sci. & Applications*, **4** (5), 325–332 (2015). DOI: 10.11648/j.ijmsa.20150405.17
- Berger S., Berger M., Bantz C., Maskos M., and Wagner E. Performance of nanoparticles for biomedical applications: The *in vitro/in vivo* discrepancy. *Biophysics Rev.*, **3** (1), 011303 (2022). DOI: 10.1063/5.0073494
- Keservani R. K., Kesharwani R. K., and Sharma A. K. *Advances in Novel Formulations for Drug Delivery* (Wiley-Scrivener, 2023).
- Tsuji T., Iryo K., Watanabe N., and Tsuji M. Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution. *Appl. Surf. Sci.*, **202**, 80–85 (2002).
- Wongrakpanich A., Geary S. M., Joiner M.-L. A., Anderson M. E., and Salem A. K. Mitochondria-targeting particles. *Nanomedicine*, **9**, 2531–2543 (2014). DOI: 10.2217/nmm.14.161
- Daniel M. C. and Astruc D. Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.*, **104** (1), 293–346 (2004). DOI: 10.1021/cr030698+
- Rufino A. T., Ramalho A., Sousa A., de Oliveira J. M. P. F., Freitas P., Gómez M. A. G., Piñeiro-Redondo Y., Rivas J., Carvalho F., Fernandes E., and Freitas M. Protective role of flavonoids against intestinal pro-inflammatory effects of silver nanoparticles. *Molecules*, **26**, 6610 (2021). DOI: 10.3390/molecules26216610
- Buchke S., Sharma M., Bora A., Relekar M., Bhanu P., and Kumar J. Mitochondria-targeted, nanoparticle-based drug-delivery systems: therapeutics for mitochondrial disorders. *Life*, **12** (5), 657 (2022). DOI: 10.3390/life12050657
- Довнар Р. И., Смотрин С. М., Ануфрик С. С., Соколова Т. Н., Анучин С. Н. и Иоскевич Н. Н. Антибактериальные и физико-химические свойства наночастиц серебра и оксида цинка. *Журн. Гродненского гос. мед. ун-та*, **20** (1), 98–107 (2022). DOI: 10.25298/2221-8785-2022-20-1-98-107
- Varlamova E. G., Gudkov S. V., Plotnikov E. Y., and Turovsky E. A. Size-dependent cytoprotective effects of selenium nanoparticles during oxygen-glucose deprivation in brain cortical cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **23** (13), 7464 (2022). DOI: 10.3390/ijms23137464
- Vodyashkin A. A., Kezimana P., Prokonom F. Y., Vasilenko I. A., and Stanishevskiy Y. M. Current methods for synthesis and potential applications of cobalt nanoparticles: A review. *Crystals*, **12** (2), 272 (2022). DOI: 10.3390/cry12020272
- Станишевская И. Е., Стойнова А. М., Марахова А. И. и Станишевский Я. М. Наночастицы серебра: получение и применение в медицинских целях. *Разработка и регистрация лекарственных средств*, **14** (1), 66–69 (2016).
- Yang L. Y., Gao J. L., Gao T., Dong P., Ma L., Jiang F. L., and Liu Y. Toxicity of polyhydroxylated fullerene to mitochondria. *J. Hazard Mater.*, **301**, 119–126 (2016). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2015.08.046
- Ануфрик С. С., Анучин С. Н. и Сергиенко И. Г. Морфология поверхностных наноструктур цветных металлов, осажденных из растворов аблированных наночастиц. *Веснік Гродзенскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя Янкі Купалы. Сер. 6. Тэхніка*, **11** (1), 59–65 (2021).
- Dovnar R., Smotrin S., Anufrik S., Anuchin S., Dovnar I., and Iaskevich N. Copper and selenium nanoparticles as a new tool against antibiotic-resistant pathogenic microorganisms. *Khirurgiya. Vostochnaya Europa – Surgery. Eastern Europe*, **11** (3), 315–328 (2022). DOI: 10.34883/pi.2022.11.3.013
- Позняк С. С., Жильцова Ю. В. и Лосева Л. П. *МВИ.МН 4092-2011 «Методика выполнения измерений массовой доли химических элементов бария, железа, кадмия, калия, кальция, кобальта, марганца, меди, никеля, свинца, серы, стронция, сурьмы, титана, хлора, хрома, цинка, циркония в почве и донных отложениях методом рентгено-флуоресценции с использованием спектрометра энергий рентгеновского излучения СЕР-01»* (МГЭУ им. А.Д. Сахарова, Мн., 2011).
- Johnson D. and Lardy H. Isolation of rat liver and kidney mitochondria. *Methods Enzymol.*, **10**, 94–96 (1967). DOI: 10.1016/0076-6879(67)10018-9
- Schummer U., Schiefer H.-G., and Gerhardt U. Mycoplasma membrane potentials determined by potential-sensitive fluorescent dyes. *Curr. Microbiol.*, **2**, 191–194 (1979).

21. Akerman K. E. and Wikström M. K. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.*, **6** (2), 191–197 (1976).
22. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., and Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** (1), 265–275 (1951).
23. Santhosh P. B., Penič S., Genova J., Iglič A., Kralj-Iglič V., and Ulrich N. P. A study on the interaction of nanoparticles with lipid membranes and their influence on membrane fluidity. *J. Physics: Conf. Ser.*, **398**, 012034 (2012). DOI: 10.1088/1742-6596/398/1/012034
24. Costa C. S., Ronconi J. V. V., Daufenbach J. F., Gonçalves C. L., Rezin G. T., Streck E. L., and da Silva Paula M. M. *In vitro* effects of silver nanoparticles on the mitochondrial respiratory chain. *Mol. Cell Biochem.*, **342** (1–2), 51–56 (2010). DOI: 10.1007/s11010-010-0467-9
25. Dong P., Li J. H., Xu S. P., Wu X. J., Xiang X., Yang Q. Q., Jin J. C., Liu Y., and Jiang F. L. Mitochondrial dysfunction induced by ultra-small silver nanoclusters with a distinct toxic mechanism. *J. Hazard Mater.*, **308**, 139–148 (2016). DOI: 10.1016/j.jhazmat.2016.01.017
26. Zhuang Y., Li L., Feng L., Wang S., Su H., Liu H., Liu H., and Wu Y. Mitochondrion-targeted selenium nanoparticles enhance reactive oxygen species-mediated cell death. *Nanoscale*, **12**, 1389–1396 (2020). DOI: 10.1039/C9NR09039H
27. Chen J., Chen C., Wang N., Wang C., Gong Z., Du J., Lai H., Lin X., Wang W., Chang X., Aschner M., Guo Zh., Wu S., Li H., and Zheng F. Cobalt nanoparticles induce mitochondrial damage and β-amyloid toxicity via the generation of reactive oxygen species. *NeuroToxicol.*, **95**, 155–163 (2023). DOI: 10.1016/j.neuro.2023.01.010
28. Zheng F., Luo Z., Lin X., Wang W., Aschner M., Cai P., Wang Y. L., Shao W., Yu G., Guo Z., Wu S., and Li H. Intercellular transfer of mitochondria via tunnelling nanotubes protects against cobalt nanoparticle-induced neurotoxicity and mitochondrial damage. *Mol. Pharmacol.*, **15** (10), 1358–1379 (2021).
29. Lienemann M. Molecular mechanisms of electron transfer employed by native proteins and biological-inorganic hybrid systems. *Comput. Structur. Biotechnol. J.*, **19**, 206–213 (2021). DOI: 10.1016/j.csbj.2020.12.004
30. Fehaid A. and Taniguchi A. The double-edged effect of silver nanoparticles is determined by their physical characteristics. *Nano Biomedicine*, **11** (2), 49–56 (2019). DOI: 10.11344/nano.11.49
31. Liu W., Wu Y., Wang C., Li H. C., Wang T., Liao C. Y., Cui L., Zhou Q. F., Yan B., and Jiang G. B. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology*, **4** (3), 319–330 (2010). DOI: 10.3109/17435390.2010.483745

## Size Characteristics and Mechanisms of Toxic Action of Selenium, Cobalt, and Silver Nanoparticles on Mitochondria of the Liver of Rats

S.S. Anufrić\*, A.I. Savko\*, S.N. Anuchin\*, T.A. Kovalenya\*, T.V. Ilyich\*, T.K. Krupskaya\*, E.A. Lapshina\*, and I.B. Zavodnik\*

\*Yanka Kupala State University of Grodno, bulv. Leninskogo Komsomola 5, Grodno, 230009, Republic of Belarus

Nanosized materials are widely used in biomedical nanotechnologies, but the mechanisms of toxic effects of metal and non-metal nanoclusters remain unclear. The aim of this work is to evaluate the size characteristics and mechanisms of toxic action of silver, selenium, and cobalt nanoparticles at the level of isolated mitochondria. Using the laser ablation method, silver (rounded, ~10–20 nm and ~50 nm), cobalt (cubic and prismatic, ~100–200 nm), and selenium (spherical, ~20–30 nm and 135–180 nm) nanoparticles with different spectral characteristics and capable of forming conglomerates were obtained. Silver, cobalt, and selenium nanoparticles (0.1–10 µg/ml) effectively inhibited the respiratory activity of isolated rat liver mitochondria by disrupting the coupling of oxidation and phosphorylation, which was accompanied by a drop in the mitochondrial membrane potential. The uncoupling effect of nanoparticles may be associated with the transfer of electrons from the electron transport chain of mitochondria to the positively charged surface of nanoparticles and depends on the size and material of the nanoparticles.

*Keywords:* nanoparticles, toxic effect, mitochondrial membranes, inhibition, respiratory activity