

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГРАФЕНОВЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК С ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ

**Т.А. Кулагова¹, Е.Н. Голубева¹, Ю.Д. Король¹, К.Н. Борисов^{1,2}, В.В. Екимчик²,
С.В. Корень³, Е.Г. Фомина³**

*¹Научно-исследовательское учреждение «Институт ядерных проблем»
Белорусского государственного университета, Минск, tatyana_kulagova@tut.by*

²Белорусский государственный университет, Минск

*³Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
Минск, Беларусь*

Использование наноразмерных структур и материалов для разработки новых терапевтических подходов противоопухолевой терапии является одним из наиболее перспективных направлений развития медицины. Применение подобных материалов в фармацевтических целях позволяет улучшать фармакологические свойства препаратов, изменять профили распределения и фармакокинетики препарата в организме, а также предоставляет возможность для направленной доставки лекарственных средств. На сегодняшний день для целей наномедицины разрабатываются и успешно используются целый ряд наноструктур, которые можно использовать в комплексе с лекарственными веществами. При этом разработка лекарственных форм предполагает возможность модификации как структурных, в том числе поверхностных, так и физико-химических свойств наночастиц для достижения максимальной эффективности терапии.

Одним из перспективных наноматериалов для разработки лекарственных форм препаратов являются графеновые квантовые точки (ГКТ), состоящие из нескольких (до 10) sp²-гибридизированных листов графена, с латеральным размером от нескольких до 10 нм. ГКТ могут быть синтезированы либо путем сборки небольших молекул, таких как лимонная кислота и глюкоза (подход «снизу вверх»), либо путем разрушения более крупных предшественников, таких как оксид графена (подход «сверху вниз»). Функционализированные ГКТ (гидроксильными, карбонильными, карбоксильными группами) обладают высокой стабильностью, низкой токсичностью, хорошей биосовместимостью, флуоресценцией [1].

Спектрально-флуоресцентные характеристики ГКТ обусловлены их размером, способом синтеза и функционализацией [1-3]. Данные структуры исследуют на применимость для визуализации клеток и тканей, адресной доставки лекарств при терапии онкологических заболеваний [1, 4], в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии [1, 5]. Помимо этого, ГКТ могут действовать как доноры и акцепторы электронов, что указывает на их антиоксидантный потенциал. Было продемонстрировано, что при действии лазерного излучения ГКТ способны как утилизировать, так и производить активные формы кислорода (АФК) в бесклеточных системах [6].

Известно, что ГКТ могут проникать через гематоэнцефалический барьер и потенциально могут использоваться в лечении опухолей мозга и нейродегенеративных заболеваний [1]. Показано, что ГКТ с разными функциональными группами обладают низкой цитотоксичностью, значительное снижение пролиферации клеток карциномы легких человека A549 и глиомы крысы C6 было зарегистрировано для amino-содержащих ГКТ в концентрации 200 мкг/мл [7]. В экспериментах *in vivo* на мышцах было показано, что ГКТ не оказывают токсического воздействия и в течение 24 ч выводятся из организма [8].

Целью данной работы было определение спектрально-флуоресцентных характеристик ГКТ при взаимодействии с компонентами плазмы крови, а также исследование влияния этих нанобъектов на жизнеспособность опухолевых клеток.

В работе были использованы ГКТ производства Sigma (USA) диаметром менее 5 нм, квантовый выход $\geq 17\%$. Спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции измеряли в водных растворах белков и плазме крови с использованием спектрофотометра PV1251 и спектрофлуориметра CM 2203 («Солар», Беларусь). Содержание плазмы в образце составило 5 %. Концентрация альбумина в растворе составляла 1,5 г/л, концентрация фибриногена – 1 г/л. Гемоглобин выделяли из эритроцитов путем лизиса эритроцитов в гипотоническом растворе (воде), анализ концентрации и типа гемоглобина проводили спектрофотометрически до и после добавления ГКТ. Концентрацию мет-гемоглобина определяли по формуле (1)

$$[\text{MetHb}] = 0,02 D_{577} - 0,04 D_{569} - 0,033 D_{500} \quad (1)$$

где, D_{577} , D_{569} , D_{500} — оптическая плотность образцов при длинах волн 577, 569, 500 нм соответственно.

Клетки почки мартовки Vero и глиомы крысы линии C6 получены из коллекции культур РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Клетки культивировали в среде Игла DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) и $1 \cdot 10^4$ г/л гентамицина. Культивирование клеток проводили в CO_2 -инкубаторе при температуре 37°C . ГКТ в концентрации 50 мкг/мл добавляли либо в ростовую среду к клеткам в монослое, либо в суспензию клеток в среде Игла DMEM. Клетки инкубировали с ГКТ 2-4 часа. Цитотоксичность исследовали методом световой микроскопии. Флуоресцентную микроскопию выполняли на микроскопе Nikon Eclipse Ti2, возбуждение светодиодом 470 нм, объектив DIC x60WI.

В соответствии с описанием производителя ГКТ имеют $\lambda_{\text{ex}}=485$ нм и $\lambda_{\text{em}}=(530\pm 10)$ нм. В измеренных нами спектрах поглощения ГКТ в водных растворах зарегистрированы максимумы поглощения при 276, 356, 460 и 488 нм. При этом наиболее интенсивное поглощение наблюдается при 276 и 488 нм. Поглощение при 276 нм соответствует $\pi-\pi^*$ -переходу sp^2 -атомов углерода и обусловлен эффектом квантового конфайнмента [9]. Остальные максимумы поглощения отражают переходы $n-\pi^*$ и переходы с энергиями близкими и/или промежуточными $\pi-\pi^*$ -переходу, в которых участвуют кислородсодержащие функциональные группы ($\text{C}=\text{O}$ / COOH) на краях и поверхности ГКТ.

Спектры флуоресценции ГКТ 50 мкг/мл при длинах волн возбуждения 273 и 470 нм представлены на рисунке 1. Видно, что для ГКТ в ФБР при обоих типах возбуждения наблюдается максимум при $\lambda_{\text{em}} = 530$ нм. При добавлении к раствору ГКТ плазмы крови (5%) зарегистрировано снижение флуоресценции, которое проявилось в большей степени для $\lambda_{\text{ex}} = 273$ нм. Эти же данные подтверждаются спектрами возбуждения ГКТ в растворах, представленными на рисунке 2. Было проведено исследование по установлению роли белков в изменении спектрально-флуоресцентных характеристик ГКТ. Основными белковыми компонентами плазмы являются альбумин, глобулины и фибриноген. Выявлено, что спектральные характеристики ГКТ не меняются в присутствии альбумина.

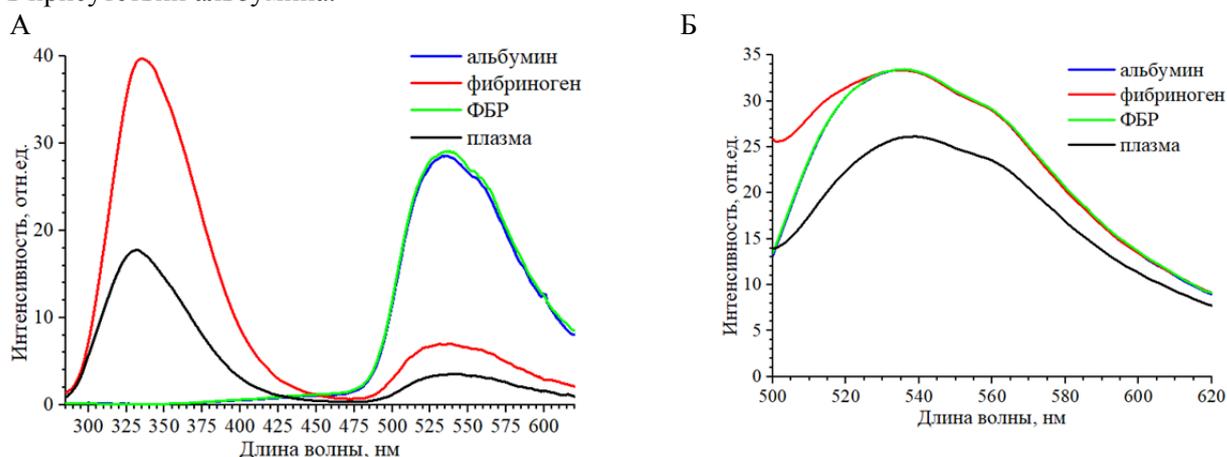


Рисунок 1. – Спектры флуоресценции графеновых квантовых точек в различных средах при возбуждении 273 нм (А) и 490 нм (Б)

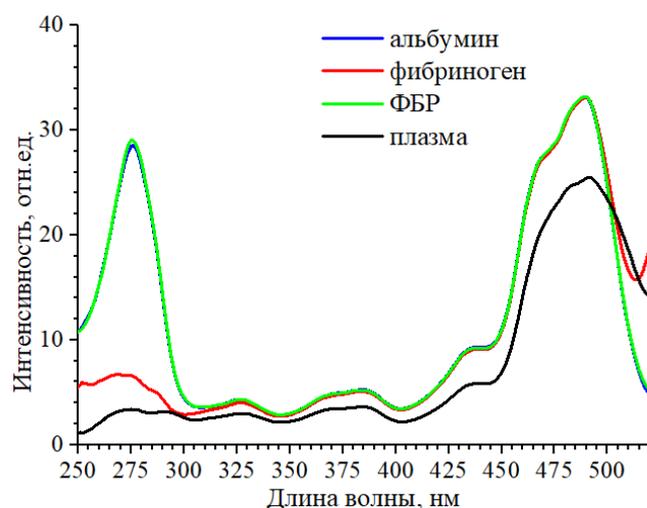


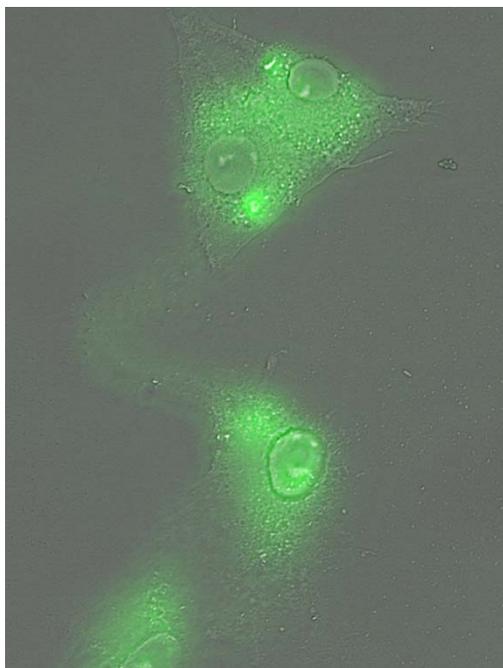
Рисунок 2. – Спектры возбуждения графеновых квантовых точек в различных средах, регистрацию сигнала осуществляли при 530 нм

Однако при взаимодействии нанобъектов с фибриногеном происходит снижение интенсивности флуоресценции ГКТ, обусловленной π - π^* -переходом sp^2 -атомов углерода. Мы предполагаем, что фибриноген образует комплексы с ГКТ, что приводит к снижению флуоресценции.

Было проведено исследование о влиянии ГКТ на гемоглобин. Выявлено, что при взаимодействии выделенного из эритроцитов гемоглобина с ГКТ в течение 0,5-4 ч спектральные характеристики белка не меняются и образование метгемоглобина не происходит.

Методом флуоресцентной микроскопии зарегистрировано достаточно равномерное накопление и распределение ГКТ в цитоплазме клеток глиомы крысы линии С6 и клеток Vero после 4 ч взаимодействия с нанобъектами. Данные представлены на рисунке 3. Выявлено, что накопление ГКТ происходит как клетками в монослое, так и клетками в суспензии.

А



Б

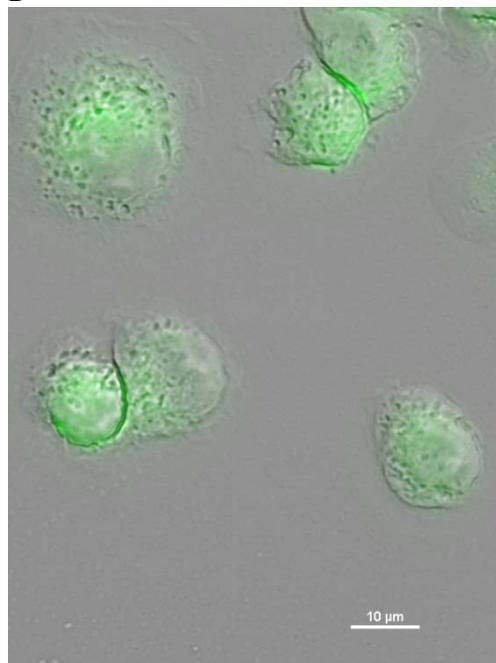


Рисунок 3. – Флуоресцентная микроскопия клеток глиомы крысы линии С6 (А) и клеток Vero (Б), накопивших графеновые квантовые точки. Время инкубирования с нанобъектами 4 ч. Длина волны возбуждения флуоресценции 470 нм.

Установлено, что накопление визуализируется в клетках уже после 2 ч инкубирования с ГКТ. Видно, что ГКТ локализуются в примембранном слое и цитоплазме клеток. При этом нанобъекты не оказывают цитотоксического действия на опухолевые клетки.

Различные исследовательские группы приходили к выводу, что ГКТ обладают низкой токсичностью. Dai et al. показали, что графеновые квантовые точки влияют на жизнедеятельность клеток только при очень высоких концентрациях. Ещё одно исследование показало, что добавление до 400 мг ГКТ к клеткам не привело к значительному угнетению их функциональной активности [4].

Таким образом, получены новые данные о взаимодействии ГКТ с белками плазмы крови. Выявлено, что ГКТ образуют комплексы с фибриногеном, что приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции нанобъектов. Представляет интерес дальнейшее исследование взаимодействия ГКТ с фибриногеном и выявление роли такого взаимодействия в процессах агрегации тромбоцитов. Установлено, что ГКТ в концентрации 50 мкг/мл не влияют на жизнеспособность опухолевых клеток, и при инкубировании накапливаются в них. Следовательно, ГКТ могут успешно быть использованы в биомедицинской практике для совершенствования фототерапевтических технологий с применением наноразмерных лекарственных форм.

Список использованных источников

1. Unravelling the potential of graphene quantum dots in biomedicine and neuroscience. / G. Perini [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, №10. – № 3712.
2. Electrochemical synthesis of small-sized red fluorescent graphene quantum dots as a bioimaging platform // X.Y. Tan, [et al.] // *Chem. Commun.* – 2015. – Vol. 51, №13 – P. 2544.
3. Graphene quantum dots: In the crossroad of graphene, quantum dots and carbogenic nanoparticles / A. Kellarakis // *Curr. Opin. Colloid In.* – 2015. – Vol. 20 – P. 354-361.
4. Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices / J. Shen, [et al.]. // *Chemical Communications.* – 2012. – Vol. 48, №31 – P. 3686–3699.
5. Superior photodynamic effect of carbon quantum dots through both type I and type II pathways: Detailed comparison study of top-down-synthesized and bottom-up-synthesized carbon quantum dots / T. Pillar-Little, [et al.]. // *Carbon* – 2018. – Vol. 140. – P. 616-623.
6. Carbon dots as antioxidants and prooxidants / I.L. Christensen, [et al.]. // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2011. – Vol. 7. – P. 667-76.
7. Cellular distribution and cytotoxicity of graphene quantum dots with different functional groups / X. Yuan [et al.]. // *Nanoscale Res. Lett.* – 2014. – Vol. 9. – P. 108.
8. In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots / M. Nurunnabi // *ACS Nano* – 2013. – Vol. 7. – P. 6858–6867.
9. Formation mechanism of graphene quantum dots and their edge state conversion probed by photoluminescence and Raman spectroscopy / G. Rajender, P. K. Giri // *J. Mater. Chem.* – 2016. – Vol. 4. – P. 10852.