

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БОР-НИТРИДНЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК С ОПУХОЛЕВЫМИ КЛЕТКАМИ****А.В. Богданова<sup>1,2</sup>, С.В. Корень<sup>3</sup>, Е.Г. Фомина<sup>3</sup>, А.Н. Бугай<sup>4</sup>, Т.А. Кулагова<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, Минск, tatyana\_kulagova@tut.by*<sup>2</sup>*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А.Д. Сахарова БГУ, Минск*<sup>3</sup>*Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск*<sup>4</sup>*Лаборатория радиационной биологии, ОИЯИ, Дубна, Россия*

Бор-нитридные квантовые точки (БНКТ) представляют собой нульмерную (0D) версию нанолитов h-BN, соответственно состоят из насыщенных шестичленных циклов с атомами В и N в вершинах. Благодаря своей химической стабильности, биосовместимости, низкой цитотоксичности и фотолюминесцентным свойствам БНКТ демонстрируют многообещающий потенциал для биовизуализации клеток, создания биосенсоров, флуоресцентных и электрохемилюминесцентных датчиков, термосенсоров [1].

Крупномасштабное получение гомогенных БНКТ является весьма сложной задачей. В настоящее время выделяют две основных стратегии синтеза БНКТ: «сверху вниз» (разрушение h-BN на наноразмерные структуры или частицы) и «снизу вверх» (сборка маленьких молекул в более крупные структуры). До сих пор многие группы синтезировали БНКТ методом «сверху вниз» [2-5]. Восходящим методам получения высококачественных БНКТ, в частности гидротермическому синтезу наночастиц, уделялось гораздо меньше внимания, что, вероятно, связано с трудностями выбора подходящих прекурсоров и условий для синтеза. Ключевыми преимуществами подхода «снизу вверх» являются возможности регулирования размера и свойств наноматериалов за счет изменения условий реакции, а также получение в ходе синтеза частиц одинаковых по размеру [6].

БНКТ были использованы для биовизуализации и маркировки опухолевых клеток MCF-7 и PC-3 [7], MDCKII [8], He-La [9] и др. Однако все ещё существуют противоречивые мнения и результаты, связанные с биосовместимостью и цитотоксичностью БНКТ, во многом определяющиеся методом синтеза и протоколом очистки и стерилизации наночастиц.

Также, БНКТ могут выступать альтернативной заменой существующим борсодержащим препаратам для бор-нейтронозахватной терапии (БНЗТ) – инновационного метода нехирургического лечения опухолей мозга [10]. Эффективность БНЗТ зависит, главным образом, от концентрации бора и его избирательного накопления именно в опухолевых клетках-мишенях. В настоящее время в клинике используются два низкомолекулярных борсодержащих препарата: L-борфенилаланин и боркапнат, которые имеют ряд недостатков, связанных как с распределением лекарственных веществ, так и выведением их метаболитов из организма [11]. БНКТ могут стать альтернативной заменой данным препаратам. Среди преимуществ БНКТ для использования в БНЗТ стоит отметить их интенсивную флуоресценцию, что позволит визуализировать процессы доставки и накопления препаратов в опухолевых клетках методом флуоресцентной микроскопии. Для возможности такого применения БНКТ, актуальным является разработка воспроизводимой методики синтеза биосовместимых наночастиц с регулируемыми оптическими свойствами.

Цель данной работы заключалась в разработке протокола синтеза люминесцирующих БНКТ, а также в исследовании их накопления в клетках.

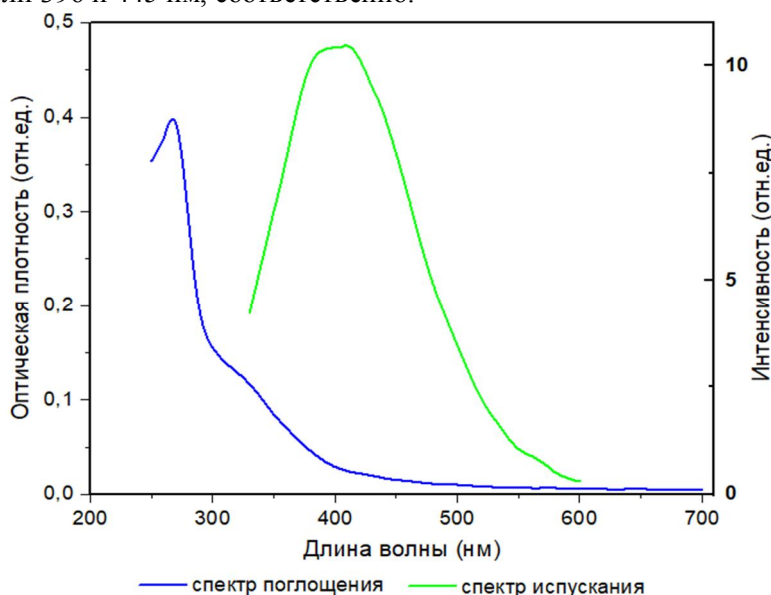
БНКТ были синтезированы гидротермическим методом из борной кислоты и мочевины— прекурсоры атомов бора и азота, соответственно. Используемая система растворителей представляла собой смесь этанола, жидкого аммиака и дистиллированной воды. Для исследования спектрально-люминесцентных свойств синтезированных наночастиц были проанализированы спектры поглощения (в диапазоне 200–700 нм) и флуоресценции (при  $\lambda_{\text{ex}}$ : 300, 320 и 375 нм) водной суспензии БНКТ с использованием спектрофлуориметра SM2203 («Солар», Беларусь).

Клетки почки собаки MDCK были получены из коллекции культур РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10 % сыворотки плодов коров,  $8 \cdot 10^{-4}$  г/мл гентамицина и  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л глутамин при температуре 37 °С в атмосфере 5 %  $\text{CO}_2$ . Концентрация клеток при пересеве составляла  $0,5 \cdot 10^5$  клеток/мл.

Водный раствор БНКТ добавляли к суспензии или монослою клеток до конечных концентраций в диапазоне 10–100 мкг/мл. Инкубирование проводили при температуре 37 °С в течение 6, 24 и 48 часов.

Жизнеспособность клеток при культивировании с БНКТ определяли методом флуориметрического анализа с использованием пропидиума иодида. Исследование накопления БНКТ в клетках проводили методом флуоресцентной микроскопии с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2. Анализ содержания бора в суспензии клеток выполнен методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе ICPE-9000 (Shimadzu, Япония). Пробоподготовку образцов проводили на приборе Milestone Ethos E (Италия) в смеси концентрированной азотной кислоты (65 %) и перекиси водорода (30%) в соотношении 1:1:1 при температуре 25°С; влажности 43 %. Калибровочные графики построены с использованием стандартных растворов ГСО. Построение калибровочных графиков, расчет концентрации бора в анализируемых образцах, оценка статистических параметров измерения производилась автоматически программным обеспечением «ICPE Solution».

На рисунке 1 представлены спектры поглощения и флуоресценции водного раствора синтезированных БНКТ в концентрации 10 мг/мл. Установлено, что полученные БНКТ имеют максимум поглощения на длине волны 270 нм и характеризуются максимумом испускания флуоресценции на длине волны 400 нм, при возбуждении на 320 нм. При возбуждении раствора БНКТ на длинах волн 300 и 375 нм были зарегистрированы примерно в 1,5 раза менее интенсивные пики флуоресценции на длинах волн 396 и 445 нм, соответственно.



**Рисунок 1. – Спектр поглощения и флуоресценции водного раствора БНКТ в концентрации 10 мг/мл, регистрация сигнала флуоресценции проводилась при возбуждении на длине волны 320 нм.**

Прежде чем оценивать накопление БНКТ в клетках, была определена жизнеспособность клеток в присутствии наночастиц. Выявлено, что БНКТ не оказывают цитотоксического действия на опухолевые клетки.

Для регистрации накопления БНКТ в клетках нами был применен метод атомно-эмиссионной спектроскопии, позволяющий зарегистрировать концентрацию бора в биожидкостях. Полученные данные представлены в таблице.

Таблица – Накопление БНКТ в клетках MDCK и внеклеточной жидкости

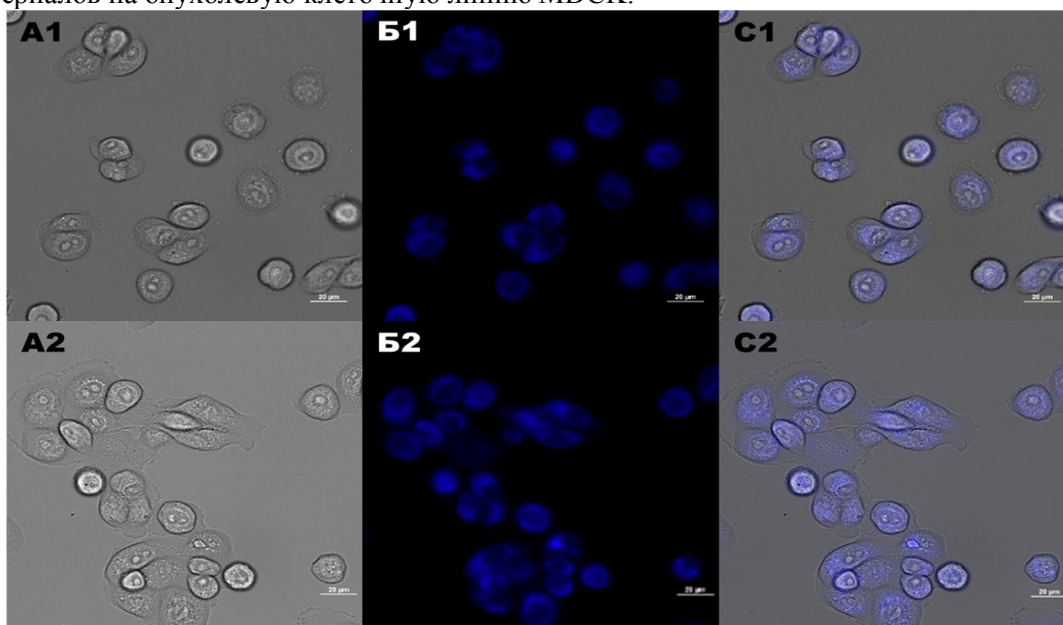
Концентрация добавленных БНКТ, мкг/мл	Концентрация бора, мкг/л	
	клетки	культуральная среда
	24 ч	
0	н/о	н/о
10	н/о	202,48±0,70
100	3,24±0,52	2003,88±6,97
	48 ч	
0	н/о	н/о
100	5,43±0,48	1019,94±11,69

При инкубировании опухолевых клеток линии MDCK в течение 24 ч с БНКТ в концентрации 10-100 мкг/мл бор регистрируется в клетках только при 100 мкг/мл. При этом количество бора в клетках в 600 раз меньше, чем в культуральной среде, то есть нет диффузионного распределения БНКТ, а клетки избирательно его накапливают.

При увеличении времени инкубирования опухолевых клеток линии MDCK с БНКТ в той же концентрации до 48 ч зарегистрировано в 2 раза больше бора в клетках и в 2 раза меньше бора во внеклеточной жидкости. При этом количество бора в клетках в 180 раз меньше, чем в культуральной среде. Следовательно, при увеличении времени культивирования клеток с БНКТ, внутриклеточная концентрация бора будет повышаться.

Также, для изучения накопления, локализации и люминесценции БНКТ в опухолевых клетках был проведен флуоресцентный микроскопический анализ. К монослою культуры клеток MDCK добавляли водный раствор БНКТ в конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали при 37 °С в течение 6 ч. Были получены и проанализированы флуоресцентные микрофотографии монослоя клеток, инкубированных с БНКТ, и контрольных клеток при возбуждении на длине волны 375 нм.

Как видно из данных, представленных на рисунке 2, интенсивность флуоресцентного сигнала в контрольных образцах и образцах с БНКТ визуально не отличается. Это обусловлено тем, что в клетках на этих длинах волн регистрируется фоновая люминесценция. Таким образом, низкого квантового выхода люминесценции БНКТ недостаточно, чтобы увидеть качественную разницу сигнала от образцов клеток. Количество и морфология клеток в образце инкубированном с БНКТ не отличается от контрольного образца, что свидетельствует об отсутствии цитотоксичности этих наноматериалов на опухолевую клеточную линию MDCK.



А – светлопольная микроскопия клеток,

Б – флуоресцентная микроскопия клеток,  $\lambda_{ex} = 365$  нм,

В – совмещенные изображения светлопольной и флуоресцентной микроскопии клеток

**Рисунок 2. – Флуоресцентная микроскопия клеток MDCK контрольной культуры (1) и накопивших БНКТ (2)**

Таким образом, в данной работе гидротермическим методом из борной кислоты и мочевины были синтезированы флуоресцентные БНКТ (максимум люминесценции при  $\lambda_{\text{ex}} = 330$  нм регистрировался при 400 нм), которые не оказывают цитотоксического действия на опухолевые клетки линии MDCK. Накопление БНКТ клетками было оценено по количеству внутриклеточного бора методом атомно-эмиссионной спектроскопии. Наилучшие результаты были получены при инкубировании клеток с БНКТ в концентрации 100 мкг/мл в течении 48 часов. Низкий квантовый выход люминесценции БНКТ не позволяет качественно оценить их локализацию в клетках при возбуждении на длине волны 365 нм. Необходимы дальнейшие исследования в направлении оптимизации условий синтеза для увеличения квантового выхода БНКТ и сдвига максимума их люминесценции в длинноволновую область спектра, для их возможного применения в качестве агента биовизуализации клеток.

#### Список использованных источников

1. Hexagonal boron nitride quantum dots: Properties, preparation and applications / X. Zhang [et al.] // Mater. Today Chem.. – 2021. – Vol. 20. – С. 1–17.
2. Fabrication and luminescence of monolayered boron nitride quantum dots / L. Lin [et al.] // Small. – 2013. – Vol. 10. – P. 60–65.
3. Controllable synthesis of highly luminescent boron nitride quantum dots / H. Li [et al.] // Small. – 2015. – Vol. 11. – P. 6491–6499.
4. Facile preparation and multifunctional applications of boron nitride quantum dots / Z. Lei [et al.] // Nanoscale. – 2015. – Vol. 7. – P. 18902–18907.
5. Thangasamy, P. Supercritical fluid facilitated disintegration of hexagonal boron nitride nanosheets to quantum dots and its application in cells imaging / P. Thangasamy, M. Santhanam, M. Sathish // ACS Appl. Mater. Interfaces. – 2016. – Vol. 8. – P. 18647–18651.
6. Nanomaterials: synthesis and applications in theranostics / G. Paramasivam [et al.] // Nanomaterials (Basel). – 2021. – Vol. 11, № 12. – P.3228.
- 7., Defect engineering route to boron nitride quantum dots and edge-hydroxylated functionalization for bio-imaging / J.H. Jung [et al.] // RSC Adv. – 2016. – Vol. 6. – P. 73939–73946.
8. Fabrication and luminescence of monolayered boron nitride quantum dots / L. Lin [et al.] // Small. – 2013. – Vol. 10. – P. 60–65.
9. Liu, Q. One-pot solvothermal synthesis of water-soluble boron nitride nanosheets and fluorescent boron nitride quantum dots / Q. Liu, C. Hu, X. Wang // Mater. Lett. – 2019. – Vol. 234. – P. 306–310.
10. Boron neutron capture therapy: a review of clinical applications / T.D. Malouff [et al.] // Front. Oncol. – 2021. – Vol. 11. –P. 601820.
11. Coderre, J.A. The radiation biology of boron neutron capture therapy / J. A. Coderre, G. M. Morris // Radiation Research. – 1999. – Vol. 151, № 1. – P. 1–18.