
БИОТЕХНОЛОГИИ

ВЛИЯНИЕ ПОКРЫТИЯ ПОЛОКСАМЕРОМ НА ТОКСИЧНОСТЬ УГЛЕРОДНЫХ ТОЧЕК НА МОДЕЛЯХ ГЛИОБЛАСТОМЫ И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПОЧКИ *IN VITRO*

В.В.Куделькина¹, Д.У.Мусаева², А.В.Сюй³, А.Н.Копылов⁴, А.М.Косырева¹,
А.И.Алексеева¹, О.В.Макарова¹, В.Ю.Тимошенко⁵

¹НИИ морфологии человека им. акад. А.П.Авцына РНЦХ им. акад. Б.В.Петровского, Москва, РФ; ²Сколковский институт науки и технологий, Москва, РФ; ³Московский физико-технический институт, Долгопрудный, РФ; ⁴НИЯУ МИФИ, Москва, РФ; ⁵МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ

Углеродные точки (УТ), получаемые методами микроволнового или гидротермального синтеза, представляют собой низкотоксичные полупроводниковые наночастицы на основе углерода, которые можно использовать для визуализации биологических объектов и для терапии опухолей. Для придания УТ новых функциональных свойств в биомедицинских целях используется покрытие поверхностно-активными веществами (ПАВ), в частности полоксамерами или плурониками, которые являются блок-сополимерами полиоксиэтилена и полиоксипропилена. Для оценки степени цитотоксичности УТ без покрытия и с ПАВ-покрытием из полоксамера проводили эксперименты *in vitro* на клеточных линиях глиобластомы мыши М6 и эмбриона почки человека НЕК293. Подсчёт числа жизнеспособных клеток (МТТ-тест) и морфологические исследования показали, что УТ в концентрациях 0.45 и 0.88 мг/мл без ПАВ-покрытия не оказывали значимого ингибирующего действия на клетки НЕК293 и М6. УТ в концентрации 0.65 мг/мл с ПАВ-покрытием (1 % раствор полоксамера) значительно снижали метаболическую активность клеток НЕК293 и М6. Таким образом, применение УТ с ПАВ-покрытием снижает метаболическую активность клеток, что в сочетании с их люминесцентными свойствами может быть использовано для одновременной терапии и диагностики опухолей.

Ключевые слова: глиобластома; НЕК293; углеродные точки; полоксамер; цитотоксичность

Углеродные точки (УТ) — новый класс углеродных наноматериалов. УТ достаточно просто и дешево синтезировать, они хорошо растворимы в воде и биосовместимы. В отличие от квантовых точек, они нетоксичны, не содержат металлов, состоят из карбоксильных групп: С

(53.93 %), Н (2.56 %), О (40.33 %) и N (1.20 %) [1]. Методами сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии установлены их размеры — от 2 до 100 нм [2]. УТ электропроводны, фотохимически и термически стабильны, безопасны для окружающей среды [3]. УТ также подходят для химической модификации органическими, полимерными, неорганическими или биологическими материалами. Они обладают фотолюминесценцией от синего до оранжевого

Адрес для корреспонденции: verakudelkina8047@gmail.com. Куделькина В.В.

DOI 10.47056/0365-9615-2024-178-10-503-508

цвета при возбуждении УФ или синим светом. Люминесценцию УТ модулируют путём их связывания с N, S, F, Se и др. [4].

УТ исследуют для визуализации биологических объектов, в качестве биозондов и биосенсоров, для измерения внутриклеточного pH, концентрации глюкозы и для доставки лекарственных веществ [5,6]. В составе композитов их применяют для доставки генов, фототермальной и фотодинамической терапии опухолей [5]. Перспективны УТ как тераностикумы — лечение с одновременной диагностикой, визуализацией клеток опухоли [6,7], в МРТ-контрастировании, интраоперационной визуализации тканей опухоли. УТ могут специфично накапливаться в опухоли, что способствует визуализации опухолевого узла, можно оценить выраженность гибели опухолевых клеток [8]. УТ связывают с гадолинием [7], аптамерами, макромолекулами, антителами, поверхностно-активными веществами (ПАВ), что придаёт им большую функциональность и способствует селективной доставке УТ и связанных с ними лекарственных и диагностических агентов [9,10].

Глиобластома — диффузная глиома взрослых IDH-дикого типа, 4 степени злокачественности, имеет агрессивное течение и крайне неблагоприятный прогноз [11]. Медианная продолжительность жизни больных глиобластомой без лечения обычно составляет 3 мес [12], после стандартной терапии — около 21 мес. Поэтому поиск новых подходов к её диагностике и лечению по-прежнему актуален. Считается, что ГЭБ в опухолях головного мозга частично нарушен. Существуют факторы, как способствующие проникновению лекарств и диагностикумов, так и препятствующие этому. Как правило, не более 1–2 % лекарственных веществ достигает тканей интрацеребральных опухолей [13]. Отметим, что мочевины, из которой обычно синтезируют УТ, может свободно диффундировать через ГЭБ — через специальные каналы, представленные в основном белком аквапорином-9 [14], что может, вероятно, также способствовать преодолению ими ГЭБ и их накоплению в тканях опухоли.

При выборе лекарственных веществ и диагностикумов важно не только высокое их накопление в тканях опухоли, но и снижение или устранение токсических эффектов. Клетки эмбриональной почки человека НЕК293 применяют в качестве биологической модели в системе доклинического скрининга на цитотоксичность диагностических и лекарственных веществ.

Полоксамеры представляют собой неионогенные триблок-сополимеры, состоящие из цен-

тральной гидрофобной цепи полиоксипропиленна, окружённой двумя гидрофильными цепями полиоксидиэтилена. Их применяют для повышения растворимости в воде гидрофобных веществ. Полоксамеры встраиваются в клеточные мембраны, изменяют их механические свойства и влияют на их вязкость [15]. Мембраны становятся более жёсткими, при этом их размер или жизнеспособность клеток не изменяется [16]. Добавление полоксамеров в биореакторы приводит к менее стрессовым условиям для клеток благодаря его амортизирующему действию. Из-за особенностей мембран опухолевых клеток полоксамеры преимущественно воздействуют на них, чем на мембраны других клеток организма. Поэтому применение УТ с ПАВ-покрытием перспективно и может повысить их накопление в тканях опухолей.

В данной работе мы оценивали противоопухолевое действие УТ с ПАВ-покрытием на клеточную линию глиобластомы мыши М6, а также их цитотоксический эффект на клеточную линию эмбриона почки человека НЕК293.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемые вещества. Коллоидные водные растворы УТ получали, используя в качестве прекурсоров мочевины и лимонную кислоту (источники атомов С и N). УТ были сферической формы, в водном растворе имели pH 5.5–6.0, наиболее вероятный размер 6 (4; 9) нм, дзета-потенциал -15 мВ и эффективную фотолюминесценцию при возбуждении УФ-светом (рис. 1). Синтез УТ проводили при растворении 300 мг мочевины (pure, Reakhim) и 150 мл лимонной кислоты (pure, Reakhim) в 5 мл дистиллированной воды. Температура синтеза УТ составила 180 °C при 1200 об/мин, время синтеза — 15 мин. После синтеза УТ охлаждали до 55 °C, синтез проходил в флаках G10. Суспензию УТ очищали диализом в деионизированной воде через мембраны MWCO 500 Да в течение 6 ч. Размер УТ изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на приборе JEOL JEM-2100 с разрешением 0.19 нм. Перед добавлением к клеточным линиям УТ растворяли до указанных концентраций в полной культуральной среде или в полной культуральной среде с 1 % неионным ПАВ полоксамером F68 (Sigma-Aldrich), выдерживали 10 мин перед внесением в лунки с клетками.

Объекты исследования. Иммуортиализованные клетки эмбриона почки человека НЕК293 и линия клеток глиобластомы мыши М6 были

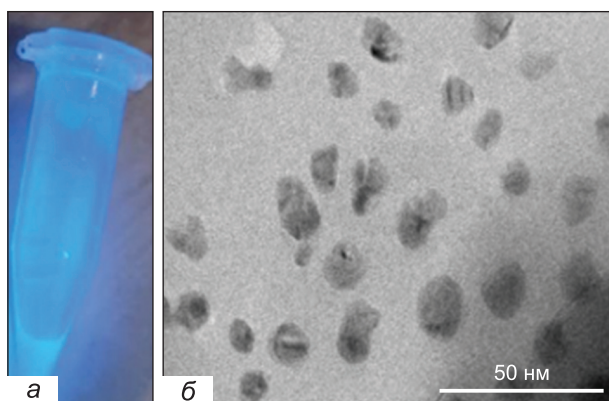
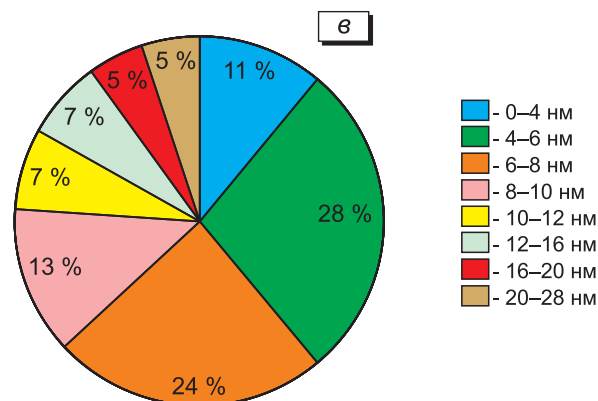


Рис. 1. Пробирка из нефлуоресцентного пластика с УТ при освещении УФ-светом (а), изображение УТ в ПЭМ (б) и распределение УТ по размерам по данным ПЭМ (в).



получены из "Коллекции экспериментальных опухолей нервной системы и нейтральных опухолевых клеточных линий" (НИИМЧ им. акад. А.П.Авцына).

Культивирование клеточных линий. Перевиваемые линии клеток НЕК293 и М6, хранящиеся в атмосфере жидкого азота, размораживали и субкультивировали в пластиковых флаконах, затем в течение 24 ч на 96-луночных планшетах (Sovtech) в количестве 10^4 клеток на лунку. Клетки культивировали в полной культуральной среде Imdm gluta max (Gibco) с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки (HyClone), 0.1 мг/мл пенициллина и стрептомицина (Gibco), при 37 °С, в атмосфере 5 % CO_2 и 95 % воздуха.

Оценка токсичности УТ (МТТ-тест). Метаболическую активность клеточных линий оценивали по восстановлению солей тетразолия (Sigma) и морфологически. Концентрации УТ без ПАВ составили 0.45 и 0.88 мг/мл, с ПАВ — 0.65 мг/мл. Для оценки цитотоксичности ПАВ к клеточным линиям добавляли раствор 1 % полоксамера. В контрольные лунки с клеточными линиями добавляли только полную культуральную среду. Через 72 ч после инкубации с исследуемыми веществами морфологически (рис. 2) оценивали пролиферацию клеток с помощью инвертированной микроскопии (Axiovert, Zeiss) и проводили цитотоксический МТТ-тест, который отражает метаболическую активность клеток. Для МТТ-теста в лунки добавляли 0.02 мл 5 % раствора МТТ-реagenta. После 2 ч инкубации среду удаляли из лунок и в каждую лунку добавляли 0.2 мл ДМСО. После полного растворения кристаллов формазана проводили спектрофотометрию образцов на микропланшетном ридере (Anthos 2010) при длине волны 495 нм. Долю жизнеспособных клеток рассчитывали по

формуле: $D_o/D_k \times 100 \%$, где D_o — оптическая плотность раствора в опытной группе, D_k — в контрольной группе.

Статистический анализ. Полученные данные анализировали в программе Statistica 8.1 (StatSoft, Inc.). Характер распределения анализируемых параметров в выборках оценивали с помощью непараметрического H критерия Крускала—Уоллиса, с последующим применением попарного сравнения с критерием Данна при $p < 0.05$. Данные представляли в виде медианы (Me) и квартилей (Q1; Q3).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам МТТ-теста медианы метаболической активности интактных клеточных линий (контроль) и после инкубации с 1 % полоксамером составили практически 100 % в пределах статистических отклонений. УТ в концентрации 0.45 и 0.88 мг/мл, растворённые в полной питательной среде, не оказывали значимого ингибирующего действия на клетки НЕК293 и М6 (рис. 2; таблица). УТ в концентрации 0.65 мг/мл с ПАВ-покрытием статистически значимо снижали метаболическую активность клеток НЕК293 по сравнению с их большей концентрацией (0.88 мг/мл) без ПАВ. Метаболическая активность клеток снижалась (11 %). Анализ множественных сравнений показал ингибирующее воздействие УТ (0.65 мг/мл) с ПАВ-покрытием на опухолевые клетки глиобластомы мыши М6. Метаболическая активность клеток также снизилась как по сравнению с контролем (12 %), так и с УТ в меньшей дозе (0.45 мг/мл) без ПАВ (12 %).

Таким образом, УТ в концентрациях 0.45 и 0.88 мг/мл не оказывали ингибирующего действия ни на клетки глиобластомы мыши М6, ни

на клетки эмбриона почки человека HEK293 в системе *in vitro*. В то время как УТ с ПАВ в концентрации 0.65 мг/мл ингибировали и клетки М6, и клетки HEK293.

Полученные нами результаты, свидетельствующие об отсутствии цитотоксичности у УТ без ПАВ-покрытия, хорошо согласуются с данными работы [17], в которой показано, что УТ (диапазон концентраций 0.1–2 мг/мл), полученные гидротермальным методом из лимонной кислоты, не оказывали цитотоксического действия ни на клетки глиобластомы, ни на клетки почки, в то время как токсичность УТ, синтезированных с использованием в качестве прекурсоров различных специй растительного происхождения, возрастала в концентрациях от 0.5 до 2 мг/мл.

В экспериментах с добавлением 1 % полоксамера УТ могли быть заключены в мицеллы из его молекул, что способствовало лучшему проникновению и накоплению УТ в клетках и снижению их метаболической активности. Предполагают, что данный ПАВ способствует проникновению наночастиц через ГЭБ, и эффективность терапии пациентов с опухолями головного мозга повышается [18]. В кровотоке на поверхности наночастиц, покрытых ПАВ, аполипопротеины крови лучше адсорбируются, что способствует преодолению ГЭБ. В зависимости от условий среды (температуры, концентрации и т. д.) для полоксамеров характерно образование мицелл и фазовые переходы. Наночастицы, мицеллы могут блокировать ионные каналы клеток, изменять внутриклеточные

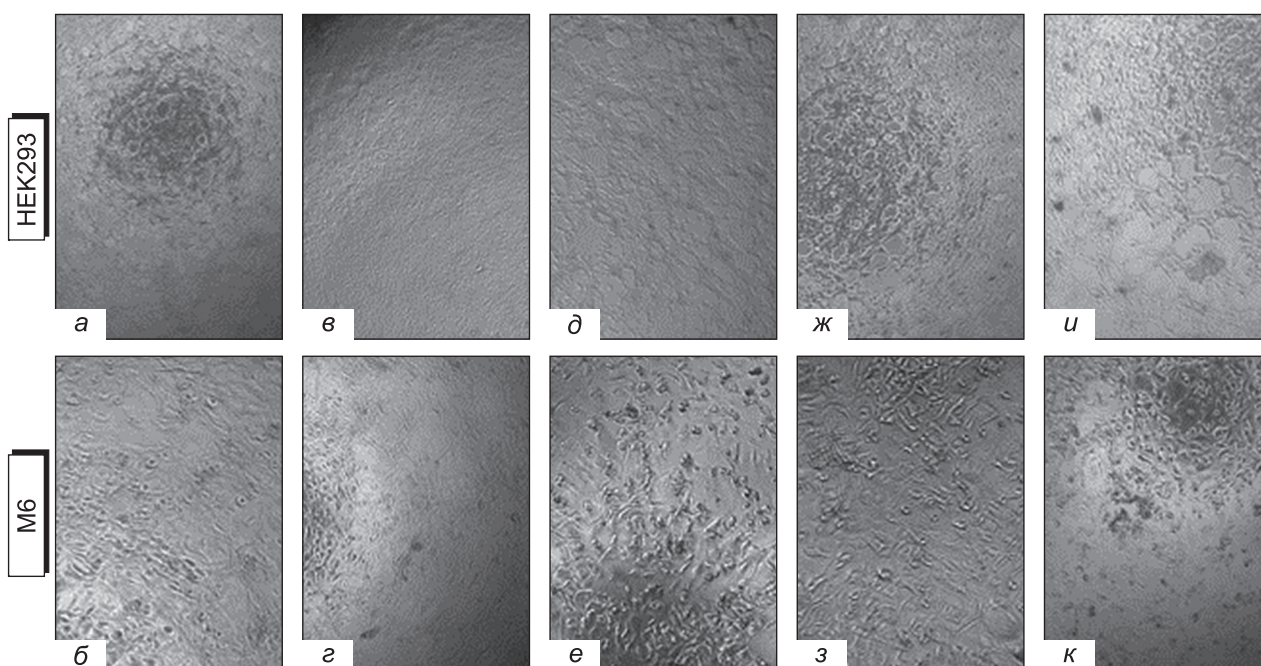


Рис. 2. Клеточные линии эмбриональной почки HEK293 и глиобластомы мыши М6 *in vitro* без воздействия (а, б) и после инкубации с 1 % полоксамером (в, в), с УТ 0.88 мг/мл (д, е), УТ 0.45 мг/мл (ж, з) и УТ 0.65 мг/мл с 1 % полоксамером (и, к). Инвертированная микроскопия, $\times 100$.

Доля метаболически активных клеток эмбриональной почки HEK293 и глиобластомы мыши М6 при воздействии исследуемых веществ (Ме (Q1; Q3), %)

Условие опыта	Клеточные линии	
	HEK 293	М6
Контроль (без УТ)	100 (82; 106)	100 (94; 102)
1 % полоксамер	100 (86; 103)	100 (94; 100)
УТ 0.45 мг/мл	95 (84; 99)	100 (94; 104)
УТ 0.88 мг/мл	93 (87; 108)	90 (82; 96)
УТ + 1 % полоксамер 0.65 мг/мл	82 (77; 87) [°]	88 (74; 90) ^{*+*}

Примечание. ^{*} $p=0.002$ по сравнению с контролем, ^{*} $p=0.0002$ по сравнению с УТ 0.45 мг/мл, [°] $p=0.046$ по сравнению с УТ 0.88 мг/мл, ^{*} $p=0.002$ по сравнению с 1 % полоксамером.

сигнальные пути, ионный гомеостаз, pH, это способствует эффективности противоопухолевой терапии [19].

Поскольку УТ могут быть получены из разных веществ, они будут различаться по цитотоксичности [17]. Сообщалось о возрастающей противоопухолевой активности УТ в концентрациях от 0.05 до 5 мг/мл [19]. Известно, что под воздействием лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона 808 нм УТ могут приводить к иммуногенной гибели опухолевых клеток и индуцировать высвобождение молекулярных клеточных структур, связанных с повреждением [20]. Таким образом, можно увеличить противоопухолевую активность УТ при условии накопления их в клетках опухоли, чему может способствовать ПАВ. Поскольку, согласно данным наших экспериментов, инкубация клеток с УТ или ПАВ не оказывала цитотоксического эффекта в исследуемых дозах ни на клетки глиобластомы, ни на клетки эмбриональной почки, это подтверждает нетоксические свойства чистых УТ, полученных экспрессным методом микроволнового синтеза. В то же время УТ с покрытием из 1 % полоксамера значимо снижали метаболическую активность как клеток опухоли, так и эмбриональной почки. При этом сама по себе добавка такой же концентрации полоксамера практически не влияла на жизнеспособность клеток. Это указывает на возможный механизм проникновения УТ с полоксамерным покрытием через клеточную мембрану. В случае с клетками глиобластомы это можно использовать для дальнейшего совершенствования противоопухолевых препаратов, а в сочетании с фотолюминесцентными свойствами УТ — и для разработки методов тераностики данного вида опухоли мозга.

Работа выполнена на научной базе "Коллекция экспериментальных опухолей нервной системы и клеточных линий нейральных опухолей" под руководством д-ра биол. наук А.М.Косыревой.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (государственное задание 123030700107-4 "Клеточные и молекулярно-биологические механизмы прогрессирования опухолей головного мозга").

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *El-Shafey A.M.* Carbon dots: Discovery, structure, fluorescent properties, and applications // *Green Processing and Synthesis*. 2021. Vol. 10, N 1. P. 134–156. doi: 10.1515/gps-2021-0006
2. *Egorova M.N., Kapitonov A.N., Alekseev A.A., Obratsova E.A.* Properties of carbon dots synthesized solvothermally from citric acid and urea // *J. Struct. Chem.* Vol. 61, N 5. P. 811–817. doi:10.1134/s00224 76620050182
3. *Liu J., Li R., Yang B.* Carbon Dots: a new type of carbon-based nanomaterial with wide applications // *ACS Cent. Sci.* 2020. Vol. 6, N 12. P. 2179–2195. doi: 10.1021/acscentsci.0c01306
4. *Jiao M., Wang Y., Wang W., Zhou X., Xu J., Xing Y., Chen L., Zhang Y., Chen M., Xu K., Zheng S.* Gadolinium doped red-emissive carbon dots as targeted theranostic agents for fluorescence and MR imaging guided cancer phototherapy // *Chem. Eng. J.* 2022. Vol. 440. ID 135965. doi: 10.1016/j.cej.2022.135965
5. *Koutsogiannis P., Thomou E., Stamatis H., Gournis D., Rudolf P.* Advances in fluorescent carbon dots for biomedical applications // *Advances in Physics: X*. 2020. Vol. 5, N 1. ID 1758592. doi:10.1080/23746149.2020.1758
6. *Hussain M.M., Khan W.U., Ahmed F., Wei Y., Xiong H.* Recent developments of Red/NIR carbon dots in bio-sensing, bioimaging, and tumor theranostics // *Chem. Eng. J.* 2023. Vol. 465, N 38. ID 143010. doi: 10.1016/j.cej.2023.143010
7. *Musaeva D.U., Kopylov A.N., Syuy A.V., Volkov V.S., Mitiushev N.D., Pavlova O.S., Pirogov Y.A., Baranov A.N., Timoshenko V.Y.* Gadolinium-doped carbon nanoparticles with red fluorescence and enhanced proton relaxivity as bimodal nanoprobe for bioimaging applications // *Appl. Sci.* 2023. Vol. 13, N 16. ID 9322. doi: 10.3390/app13169322
8. *Shen C.L., Liu H.R., Lou Q., Wang F., Liu K.K., Dong L., Shan C.X.* Recent progress of carbon dots in targeted bioimaging and cancer therapy // *Theranostics*. 2022. Vol. 12, N 6. P. 2860–2893. doi: 10.7150/thno.70721
9. *Miyazawa T., Itaya M., Burdeos G.C., Nakagawa K., Miyazawa T.* A critical review of the use of surfactant-coated nanoparticles in nanomedicine and food nanotechnology // *Int. J. Nanomedicine*. 2021. Vol. 16. P. 3937–3999. doi: 10.2147/IJN.S298606
10. *Yang Y., Zhao M., Lai L.* Surface activity, micellization, and application of nano-surfactants — amphiphilic carbon dots // *Carbon*. 2022. Vol. 202, N 11. P. 398–413. doi: 10.1016/j.carbon.2022.11.012
11. *Liu D., Dai X., Ye L., Wang H., Qian H., Cheng H., Wang X.* Nanotechnology meets glioblastoma multiforme: Emerging therapeutic strategies // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2023. Vol. 15, N 1. ID e1838. doi: 10.1002/wnan.1838
12. *Neurology and clinical neuroscience* / Eds A.H.Schapira, H.E.Byrne. Philadelphia, 2007.
13. *Ambruosi A., Gelperina S., Khalansky A., Tanski S., Theisen A., Kreuter J.* Influence of surfactants, polymer

- and doxorubicin loading on the anti-tumour effect of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in a rat glioma model // *J. Microencapsul.* 2006. Vol. 23, N 5. P. 582–592. doi: 10.1080/02652040600788080
14. *Badaut J., Brunet J.F., Regli L.* Aquaporins in the brain: from aqueduct to “multi-duct” // *Metab. Brain Dis.* 2007. Vol. 22, N 3–4. P. 251–263. doi: 10.1007/s11011-007-9057-2
15. *Batrakova E.V., Kabanov A.V.* Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers // *J. Control. Release.* 2008. Vol. 130, N 2. P. 98–106. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.04.013
16. *Guzniczak E., Jimenez M., Irwin M., Otto O., Willeoughby N., Bridle H.* Impact of poloxamer 188 (Pluronic F-68) additive on cell mechanical properties, quantification by real-time deformability cytometry // *Biomechanics.* 2018. Vol. 12, N 4. ID 044118. doi: 10.1063/1.5040316
17. *Vasimalai N., Vilas-Boas V., Gallo J., Cerqueira M.F., Menéndez-Miranda M., Costa-Fernández J.M., Diéguez L., Espiña B., Fernández-Argüelles M.T.* Green synthesis of fluorescent carbon dots from spices for in vitro imaging and tumour cell growth inhibition // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2018. Vol. 9. P. 530–544. doi: 10.3762/bjnano.9.51
18. *Maksimenko O., Malinovskaya J., Shipulo E., Osipova N., Razzhivina V., Arantseva D., Yarovaya O., Mostovaya U., Khalansky A., Fedoseeva V., Alekseeva A., Vanchugova L., Gorshkova M., Kovalenko E., Balabanyan V., Melnikov P., Baklaushev V., Chekhonin V., Kreuter J., Gelperina S.* Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development // *Int. J. Pharm.* 2019. Vol. 572. ID 118733. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118733
19. *Xia J., Kawamura Y., Suehiro T., Chen Y., Sato K.* Carbon dots have antitumor action as monotherapy or combination therapy // *Drug Discov. Ther.* 2019. Vol. 13, N 2. P. 114–117. doi: 10.5582/ddt.2019.01013
20. *Wu Y., Zhu J., Li Q., Yang M., Sun X., Zheng G., Du F., Zhang M.* Fabrication of manganese-coordinated polyphenol carbon dots for photothermal therapy and immune activation // *Cancer Nanotechnol.* 2022. Vol. 13, N 1. ID 30. doi: 10.1186/s12645-022-00136-9

Получено 28.05.24