

УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТОЧКИ, ПОЛУЧЕННЫЕ МИКРОВОЛНОВЫМ СИНТЕЗОМ: ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ НА МОДЕЛИ ГЛИОБЛАСТОМЫ И ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПОЧКИ *IN VITRO*

© 2025 г. А. Н. Копылов^{a, *}, Д. У. Мусаева^a, В. В. Куделькина^b, А. В. Сюй^c, А. М. Косырева^b, А. И. Алексеева^b, А. Ю. Захаркин^a, В. Ю. Тимошенко^{a, d}

^aНациональный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, 115409 Россия

^bНаучно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына, Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, 117418 Россия

^cМосковский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

^dМосковский государственный университет, Москва, 119991 Россия

*E-mail: lex.kopylov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 31.05.2023 г.

Принята к публикации 05.06.2023 г.

Углеродные наноточки (УНТ), получаемые жидкостными методами синтеза, представляют собой пример биосовместимого нетоксичного наноматериала с перспективными для различных применений физическими свойствами. В нашей работе УНТ были получены из органических прекурсоров экспрессным методом синтеза в микроволновом реакторе с последующей очисткой в изопропиловом спирте и исследованы методами просвечивающей электронной микроскопии, инфракрасной спектроскопии, оптической спектроскопии поглощения в ультрафиолетовом-видимом-ближнем инфракрасном диапазонах, а также методом фотолюминесценции. Оценка цитотоксичности выполнялась на моделях глиобластомы и эмбриональной почки *in vitro*. Полученные результаты свидетельствуют о перспективах использования метода синтеза УНТ при получении наноматериалов для биомедицинской люминесцентной диагностики.

Ключевые слова: наноточки, микроволновой синтез, цитотоксичность, глиобластомы.

DOI: 10.56304/S2079562924050270

ВВЕДЕНИЕ

Углеродные наноточки (УНТ), которые представляют собой преимущественно наночастицы на основе углерода с характерными размерами от единиц до нескольких десятков нанометров, были впервые целенаправленно синтезированы и исследованы в 2004 г. Их отличительные особенности, такие как низкая токсичность и настраиваемая по спектру эффективная фотолюминесценция, делают их перспективными для широкого диапазона применений [1]. Дополнительное преимущество заключается в возможности синтеза УНТ из дешевых и легкодоступных углеродсодержащих материалов и даже биоотходов [2]. Они могут использоваться во многих областях – в оптических информационных технологиях, химическом катализе и биомедицине.

Существуют различные способы синтеза УНТ – гидротермальный, сольвотермальный, с помощью

микроволнового реактора. Гидротермальный путь включает прогрев водного раствора в контейнере из инертного материала в печи и позволяет получать чистый водный раствор частиц без токсичных растворителей, что очень важно для биомедицины. Однако гидротермальный синтез очень затратен во времени, занимает много часов и может не подходить для синтеза УНТ с красной люминесценцией [3]. Сольвотермальный синтез аналогичен гидротермальному, но в ходе него используются специальные растворители, например, диметилформамид. Данный способ более универсален, так как растворители дают возможность корректировать синтез, но полученные частицы будут находиться в этом растворителе, и для биомедицинских целей потребуется очистка [4].

Микроволновый реактор аналогичен гидротермальному, но для нагрева используется гига-герцовое электромагнитное излучение, что позво-

ляет гораздо быстрее получить большие количества частиц, а синтез может занимать всего несколько минут. Кроме того данный метод позволяет получать УНТ с высоким квантовым выходом люминесценции [3]. УНТ могут быть получены из большого разнообразия материалов – апельсиновой кожуры, лимонной кислоты, яблочной кислоты, различных углеродсодержащих соединений. Получаемые УНТ перспективны для применений в биомедицине, в том числе при доставке лекарств, генов, гипертермии опухолей, и уничтожении бактерий [4]. Отдельно стоит отметить, что подобные нанообъекты хорошо подходят для биовизуализации ввиду их низкой токсичности по сравнению с квантовыми точками на основе тяжелых металлов.

Целью нашего исследования являлось получение в микроволновом реакторе и первичная характеристика УНТ, перспективных для биомедицинских применений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

УНТ были синтезированы в микроволновом реакторе Anton Paar (Чехия) из 300 мг мочевины, 150 мг лимонной кислоты в 5 мл дистиллированной воды в стеклянных виалах объемом 10 мл. Параметры реактора: температура – 180°C, время синтеза – 15 минут, скорость перемешивания – 1200 об./мин, охлаждение после синтеза до 55°C. Полученные растворы очищали добавлением изопропилового спирта, с последующим переводом очищенных фракций в дистиллированную воду.

Структура, форма и размеры частиц исследовались методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) высокого разрешения на приборе JEOL JEM-2100 с разрешением 0.19 нм.

Измерения спектров экстинкции проводились на спектрофотометре УФ-ВИС 752Р в диапазоне 200–900 нм с разрешением 3 нм.

ИК-Фурье спектроскопия водных растворов УНТ проводилась на приборе Bruker IFS-66v/s в диапазоне 500–4000 cm^{-1} и шагом 4 cm^{-1} в геометрии многократно-нарушенного полного внутреннего отражения. Спектры фотolumинесценции при возбуждении с длинами волн 365, 405 и 532 нм измерялись с помощью спектрометра TP2000P OPTOSKY в интервале от 200 до 1100 нм с разрешением 1 нм.

Цитотоксичность УНТ оценивали стандартным методом МТТ по восстановлению солей тетразолия (Sigma, США). Через 24 ч после субкультивирования на 96 луночных планшетах к клеткам опытной группы добавляли исследуемые препараты в разных растворителях (по 6 повторов на каждую группу). Препараты растворяли в культуральной среде в концентрации 0.88 и 0.45 мг/мл. В контрольные лунки добавляли только полную культуральную среду. Через 72 ч после инкубации

с исследуемыми препаратами на качественном уровне – морфологически оценивали пролиферацию клеток с помощью инвертированного микроскопа (Zeiss Axiovert, Германия). Проводили цитотоксический МТТ-тест, отражающий метаболическую активность клеток: в лунки было добавлено 0.02 мл 5% раствора МТТ-реагента, после 2-х часов инкубации среда была удалена из лунок и добавлено 0.2 мл ДМСО в каждую лунку. После полного растворения кристаллов формазана проводили спектрофотомерию образцов на микропланшетном ридере (Anthos 2010, Австрия) при длине волн 495 нм. Жизнеспособность рассчитывали по формуле: % жизнеспособных клеток = $Do/Dk \cdot 100\%$; где Do – оптическая плотность раствора в опытной группе и Dk – оптическая плотность раствора в контроле [5].

Для МТТ теста использовались перевиваемые линии клеток эмбриона почки НЕК-293 и глиобластомы мыши М6 (Коллекция экспериментальных опухолей нервной системы и нейральных опухолевых клеточных линий НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына" ФГБНУ "РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского", Россия, <http://www.morfolium.ru/unikalnaya-nauchnaya-ustanovka/>), хранящихся в атмосфере жидкого азота, размораживали и субкультивировали сначала в пластиковых флаконах, а затем на 96 луночных планшетах в количестве 10^4 клеток на лунку, инкубировали 24 ч. Клетки культивировали в среде IMDM Gluta Max (Gibco, США) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (Hyclone, США) или без нее (бессывороточная культуральная среда), 0.1 мг/мл антибиотика пенициллина + стрептомицина (Gibco, США) при $t = 37.0^\circ\text{C}$, в атмосфере 5% углекислого газа и 95% воздуха.

Также к клеткам глиобластомы были добавлены УНТ в растворе плуроника, используемого для прохождения частиц через гематоэнцефалический барьер при терапии опухолей головного мозга чтобы установить цитотоксичность данного раствора.

Экспериментальные данные анализировали в программе STATISTICA 8.1. Полученные показатели сравнивали с помощью непараметрического Н-критерия Краскела–Уоллиса (сравнение множественных независимых групп). Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате исследования УНТ методом просвечивающей электронной микроскопии (рис. 1a) было построено распределение по размерам, которое носит логнормальный характер (рис. 1b). ПЭМ высокого разрешения показал, что частицы имеют практически сферическую форму и слоистую внутреннюю структуру (рис. 1б).

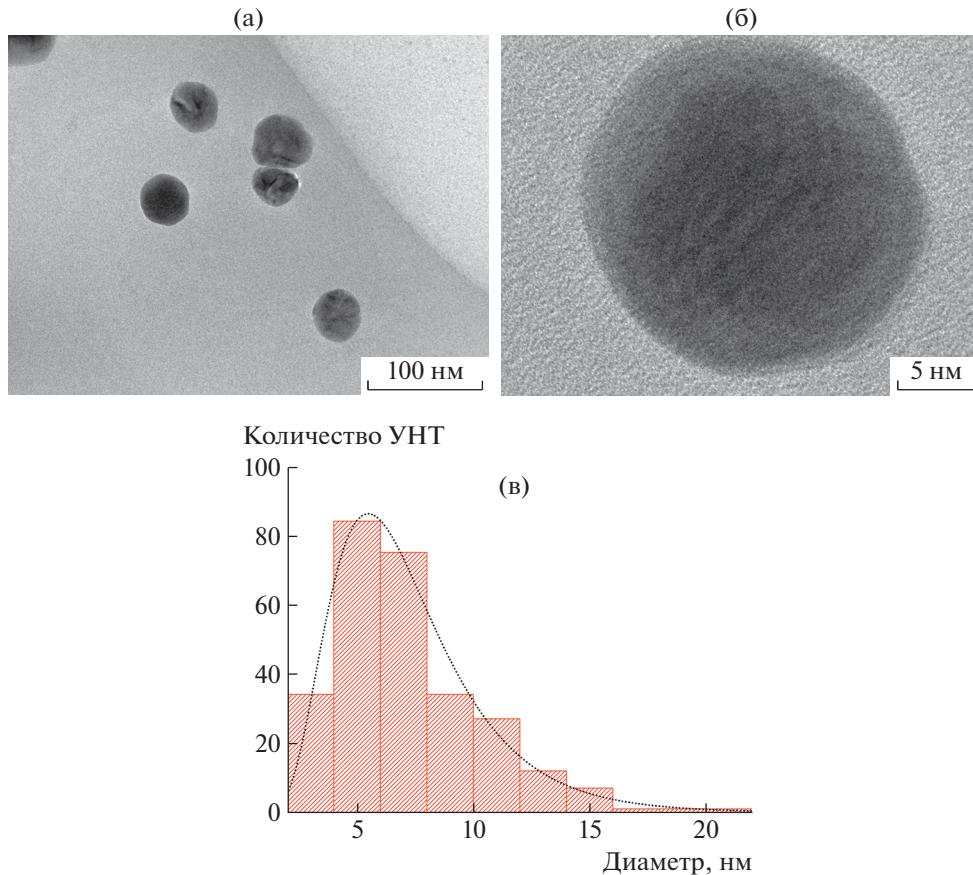


Рис. 1. ПЭМ изображения УНТ (а); гистограмма распределения размеров УНТ по данным ПЭМ (б).

Полосы поглощения УНТ определялись по спектрам экстинкции при разведении полученных растворов до 0.1 мг/мл. Основные максимумы поглощения соответствуют длинам волн 235, 360 и 510 нм (рис. 2).

Химические связи в УНТ исследовались методом ИК-Фурье спектроскопии (рис. 3). Обнаружены полосы поглощения, соответствующие линиям C–N (1400 см^{-1}), C=O (1645 см^{-1}), C–H (2811 см^{-1}), O–H/N–H (3360 см^{-1}). Наличие связей C–N на поверхности углеродных точек по данным [6] является причиной возникновения красной люминесценции.

Спектры фотолюминесценции при лазерном возбуждении с длинами волн 365, 404 и 532 нм представляли собой широкие полосы с максимумами на длинах волн 460, 490 и 600 нм соответственно.

Полученные результаты исследований *in vitro* свидетельствуют, что УНТ с концентрацией 0.45–0.88 мг/мл не оказывают статистически достоверного цитотоксического действия на клетки глиобластомы M6 мыши и эмбриона почки человека

HEK 293, но добавление плуроника вызвало повышение цитотоксичности (табл. 1).

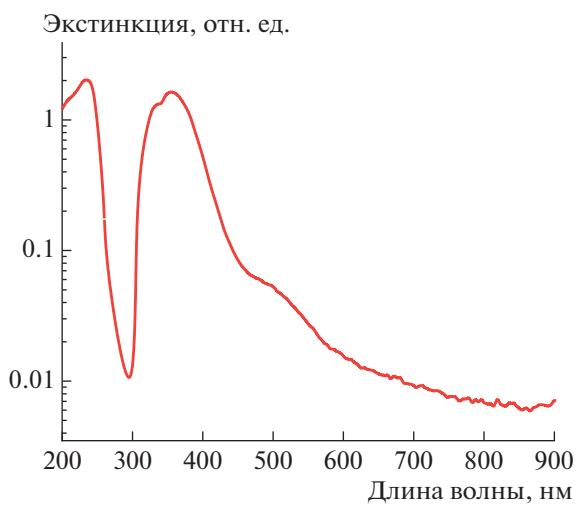


Рис. 2. Спектр экстинкции водного раствора УНТ с концентрацией 0.1 мг/мл.

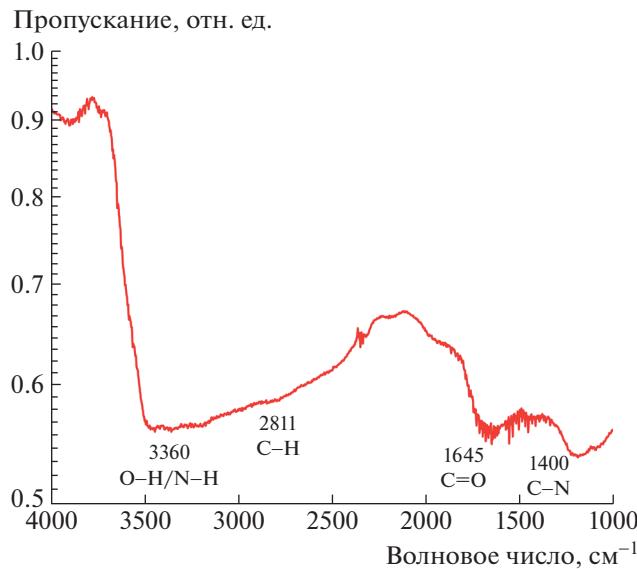


Рис. 3. ИК-спектр пропускания водного раствора УНТ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Методом микроволнового синтеза были получены УНТ, максимумы оптического поглощения которых составили 250, 400, 510 нм. Наличие полосы поглощения в зеленой области позволяет получать эффективную люминесценцию с максимумом в районе 610 нм, что из-за близости к окну биологической прозрачности тканей делает перспективным применение таких УНТ в биомедицинской оптической диагностике. Очищение изопропиловым спиртом привело к усилению красной люминесценции.

Таблица 1. Процент метаболически активных клеток линий эмбриональной почки HEK-293 и глиобластомы M6 при воздействии исследуемых препаратов и их сочетаний, Медиана (Q1; Q3), %

Группы наблюдения	Клеточные линии	
	HEK-293	M6
Контроль	100 (82;106)	100 (94;102)
УНТ в полной культуральной среде (0.88 мг/мл)	93 (87;108)	90 (82;96)
Углеродные точки в полной культуральной среде (0.45 мг/мл)	95 (84;99)	100 (94;104)
Углеродные точки в 1% растворе F 68 в полной культуральной среде (0.65 мг/мл)	82 (77;87) <i>p</i> < 0.046	88 (74; 90) <i>p</i> < 0.002*

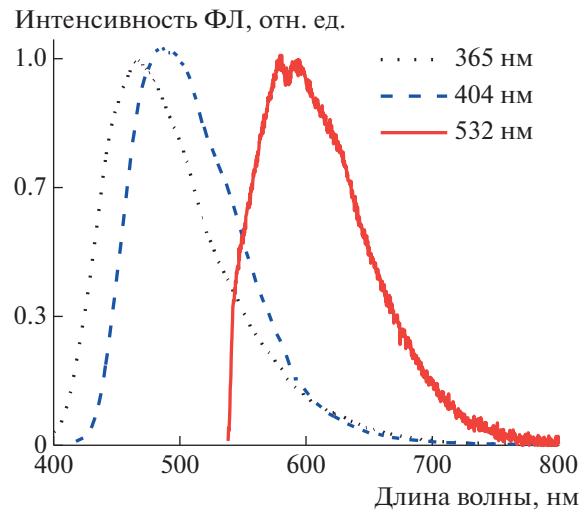


Рис. 4. Спектры фотолюминесценции водных растворов УНТ при лазерном возбуждении с длинами волн 365, 404 и 532 нм, что давало максимумы на длинах волн 460, 490 и 600 нм соответственно.

Полученные УНТ обладали низкой цитотоксичностью, не было зарегистрировано статистически достоверного воздействия на пролиферацию как клеток почек, так и опухолевых клеток. Это соответствует данным литературы, именно низкая токсичность УНТ делает их перспективными для биомедицинского применения, более привлекательными, чем уже используемые на данный момент времени материалы, например, квантовые точки на основе тяжелых металлов. Добавление плуроника F-68 к раствору УНТ повышает цитотоксичность, несмотря на сниженную концентрацию УНТ в данном растворе, что, вероятно, обусловлено возможной токсичностью плуроника [7], либо стимулированным данным препаратом процессом эндоцитоза УНТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя заключение можно сказать, что углеродные наноточки, полученные из мочевины и лимонной кислоты экспресс-методом синтеза в микроволновом реакторе, обладают низкой цитотоксичностью и имеют интенсивную люминесценцию в красной области спектра, что делает их перспективным наноматериалом для дальнейшего изучения с целью создания наноагентов для люминесцентной биовизуализации, а также при дальнейшей модификации и функционализации – контрастных агентов для МРТ и сенсибилизаторов локальной гипертермии опухолей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (Гос. задание 123030700107-4 клеточные и молекулярные механизмы опухолевой прогрессии).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. *Koutsogiannis P., Thomou E., Stamatis H., et al. // Adv. Phys. 2020. V. 5 (1). P. 1758592.*
<https://doi.org/10.1080/23746149.2020.1758592>

2. *Liu J., Rui L., Bai Y. // ACS Cent. Sci. 2020. V. 6. P. 2179–2195.*
3. *Wang J., Zhu Y., Wang L. // Chem. Rec. 2019. V. 19. P. 1–13.*
4. *Azam N., Najabat Ali M., Javaid Khan T. // Front. Mater. 2021. V. 8. P. 700403.*
5. *Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. (1–2). P. 55–63.*
6. *Yan F. et al. // Microchim. Acta. 2019. V. 186. P. 1–37.*
7. *Meng-Zhu Y., Yu-Lan H., Xiao-Xia S., Jun L., et al. // Chem. Biol. Interact. 2016. V. 250. P. 47–58.*
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.013>

Carbon Nanodots Obtained by Microwave Synthesis: Physical Properties and Assessment of Cytotoxicity on a Model of Glioblastoma and Embryonal Kidney In Vitro

A. N. Kopylov^{1, *}, D. U. Musaeva¹, V. V. Kudelkina², A. V. Syui³, A. M. Kosyreva², A. I. Alekseeva¹, A. Yu. Zakharkiv¹, and V. Yu. Timoshenko^{1, 4}

¹*National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia*

²*Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovskii Russian Scientific Center for Surgery, Moscow, 117418 Russia*

³*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow oblast, 141701 Russia*

⁴*Moscow State University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: lex.kopylov@gmail.com

Received May 30, 2023; revised May 31, 2023; accepted June 5, 2023

Abstract—Carbon nanodots (CNDs) produced by liquid-based synthesis methods are an example of a biocompatible, nontoxic nanomaterial with physical properties promising for various applications. In our work, CNDs were obtained from organic precursors by express synthesis in a microwave reactor followed by purification in isopropyl alcohol and were studied by transmission electron microscopy, infrared spectroscopy, and optical absorption spectroscopy in the ultraviolet–visible–near-infrared range, as well as photoluminescence. Cytotoxicity assessment was performed on in vitro models of glioblastoma and embryonic kidney. The obtained results indicate the prospects of the used method of CND synthesis in the production of nanomaterials for biomedical luminescent diagnostics.

Keywords: nanodots, microwave synthesis, cytotoxicity, glioblastoma