

УДК 57.086.8

А.В. БОГДАНОВА<sup>1,2</sup>, А.А. ДЕНИСОВ<sup>2,3</sup>, Т.А. КУЛАГОВА<sup>1</sup>, С.Г. ПАШКЕВИЧ<sup>3</sup>

## ПРИМЕНЕНИЕ ГРАФЕНОВЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК ДЛЯ БИОВИЗУАЛИЗАЦИИ КЛЕТОК НЕРВНОЙ ТКАНИ *IN VITRO* И *IN VIVO*

<sup>1</sup> НИУ «Институт ядерных проблем» БГУ, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup> Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

В работе исследуется взаимодействие клеток нервной ткани с графеновыми квантовыми точками. Выявлено, что данный наноматериал не оказывает цитотоксического действия на клетки. Продемонстрирована возможность применения графеновых квантовых точек для неселективной биовизуализации клеток нервной ткани *in vitro*. В результате выполненных экспериментов *in vivo* установлено, что при интраназальном введении графеновые квантовые точки способны гетерогенно распределяться и накапливаться в мозге.

*Ключевые слова:* клетки нервной ткани, графеновые квантовые точки, флуоресцентная микроскопия.

**Введение.** Одним из наиболее важных аспектов в улучшении терапии заболеваний нервной системы является разработка более эффективных методов диагностики, в частности методов биовизуализации структур нервной ткани и мозга в целом [1]. Методы визуализации центральной нервной системы, активно применяющиеся в медицинской диагностике, такие как магнитно-резонансная томография и позитронно-эмиссионная томография/рентгеновская компьютерная томография, не могут обеспечить пространственное разрешение на уровне отдельных клеток. Молекулярная визуализация нейронов *in vitro* и *ex vivo* методом оптической флуоресцентной микроскопии открывает пути решения данной проблемы благодаря ее неразрушающему характеру, высокой чувствительности и использованию широкодоступного и относительно недорогого оборудования [2]. В связи с этим актуальным является создание стабильных, нетоксичных флуоресцентных зондов, способных проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и накапливаться в клетках нервной ткани. Наноструктуры с разнообразным химическим составом поверхности, а также регулируемые оптическими свойствами могут быть использованы для создания инновационных методов нейровизуализации [3].

За последнее десятилетие был исследован ряд наноструктур (липосом, нанотрубок, полупроводниковых квантовых точек, дендримеров и т.д.) в качестве перспективных агентов для биовизуализации. Варьирование и подбор оптимальных значений таких параметров наночастиц, как заряд, размер, форма и гидрофильность может значительно повысить эффективность таргетной доставки флуоресцирующей метки к заданной цели [4]. Углеродные наноматериалы часто предлагаются в качестве оптимальных кандидатов для нейробиомедицинских применений ввиду своей низкой токсичности, высокой механической прочности, высокой тепло- и электропроводности и, в некоторых случаях, собственной флуоресценции [5].

Одним из представителей интенсивно флуоресцирующих углеродных наноматериалов являются графеновые квантовые точки (ГКТ) – квазисферические наночастицы, состоящие из одного или нескольких слоев графена с поперечными размерами <10 нм. Относительно недавно начали появляться работы по использованию ГКТ в области нейрофизиологии, в частности, в качестве нетоксичных флуоресцирующих агентов для нейрональных стволовых клеток человека [6]. Ключевым элементом, делающим использование ГКТ в области нейрофизиологии крайне перспективным, является растущее количество экспериментальных данных, указывающих на их способность преодолевать ГЭБ [7]. Например, ГКТ, конъюгированные с трансферрином, используются как эффективные контролируемые системы доставки противоопухолевого препарата доксорубицина в мозг [8].

В данной работе проведены исследования особенностей накопления ГКТ клетками нервной ткани и возможности использования их в качестве флуоресцирующих агентов для визуализации нервной ткани *in vitro* и *in vivo*.

**Материалы и методы исследования.** Для проведения экспериментов были использованы водорастворимые ГКТ (компания Sigma, США) диаметром менее 5 нм, максимум поглощения 485 нм, максимум испускания  $530 \pm 10$  нм, квантовый выход  $\geq 17\%$ .

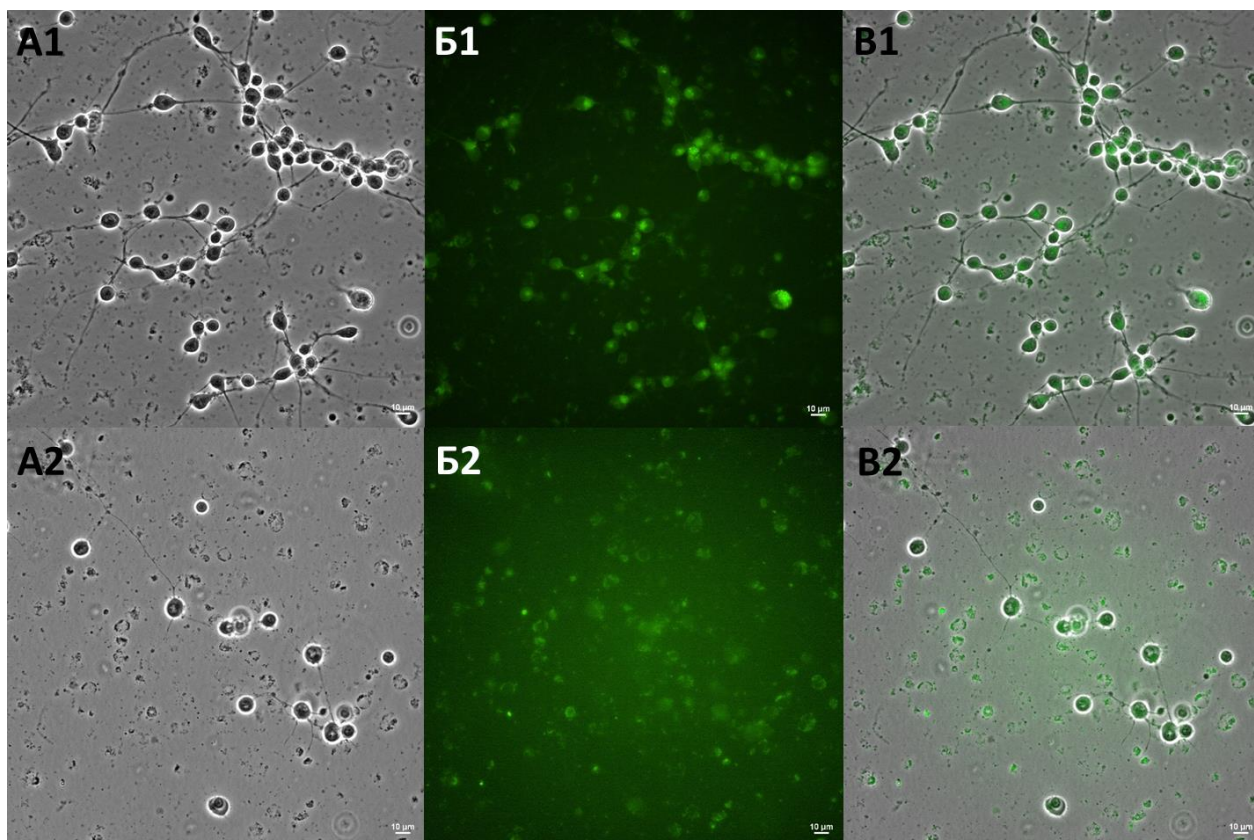
Для оценки взаимодействия ГКТ с клетками нервной ткани *in vitro* была использована первичная культура нейронов, выделенная из коры головного мозга новорожденных крыс методами механической и ферментативной дезагрегации образцов ткани. Полученные после декапитации крыс фрагменты ткани коры головного мозга помещали в 0,25% трипсин (содержащий ЭДТА; Sigma, США) и измельчали до  $1 \text{ мм}^3$  с помощью микроножниц, пипетировали для гомогенизации и инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение нескольких минут. После дезактивации реакции расщепления ткани под действием трипсина суспензию фильтровали через сито с ячейками 70 мкм и центрифугировали. Клетки ресуспензировали в культуральной среде Neurobasal Medium (Gibco, Великобритания) со специализированной добавкой B-27 для культивирования нейронов и глутамином. Высевание клеток проводилось на стекла, покрытые поли-D-лизином (PDL, Merck KGaA, Германия) для лучшей адгезии к культуральной поверхности. Также был создан адгезивный слой, состоящий из PDL и суспензированных в нем ГКТ в концентрации 50 мкг/мл. Культуру первичных нейронов инкубировали в термостате при  $37^\circ\text{C}$ , во влажной атмосфере, содержащей 5%  $\text{CO}_2$ . Каждые 3–4 суток осуществляли частичную (~50%) смену ростовой среды. Оценку накопления ГКТ клетками нервной ткани проводили на 3 и 5 день *in vitro* (DIV). Для этого нейроны инкубировали в фосфатном-буферном растворе (PBS, pH = 7,3) с добавлением ГКТ в концентрации 50 мкг/мл в течение 1 часа. Морфологические и флуоресцентные характеристики клеток нервной ткани, культивируемые на адгезивном слое, содержащем ГКТ, анализировали на 3 DIV.

Для изучения взаимодействия ГКТ с клетками нервной ткани крысы *in vivo* раствор наночастиц концентрацией 100 мкг/мл вводили крысам интраназально в объеме 50 мкл. В качестве контрольных образцов были исследованы срезы мозга крысы после введения физиологического раствора (NaCl в концентрации 0,9 мг/мл) в том же объеме и временном промежутке инкубирования. Через 5 и 24 часа после введения ГКТ крыс декапитировали. После извлечения мозга готовили поперечные срезы органа (толщиной 20 мкм) при помощи криомикротомы. Опыты проводили в соответствии с биоэтическими нормами работы с экспериментальными животными.

Накопление, распределение ГКТ в срезах мозга крысы и первичной культуре нейронов выполняли методом флуоресцентной микроскопии с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Япония). Изображения обрабатывали с помощью программы NIS-Elements AR Analysis (Nikon, Япония).

**Результаты и их обсуждение.** Методом фазово-контрастной микроскопии было оценено общее количество и морфология клеток нервной ткани, прикрепившихся к покрытию из PDL (контроль) и PDL+ГКТ после посева диссоциированных нейронов. Методом флуоресцентной микроскопии была изучена способность ГКТ, содержащихся в подложке, накапливаться в клетках, растущих на такой поверхности.

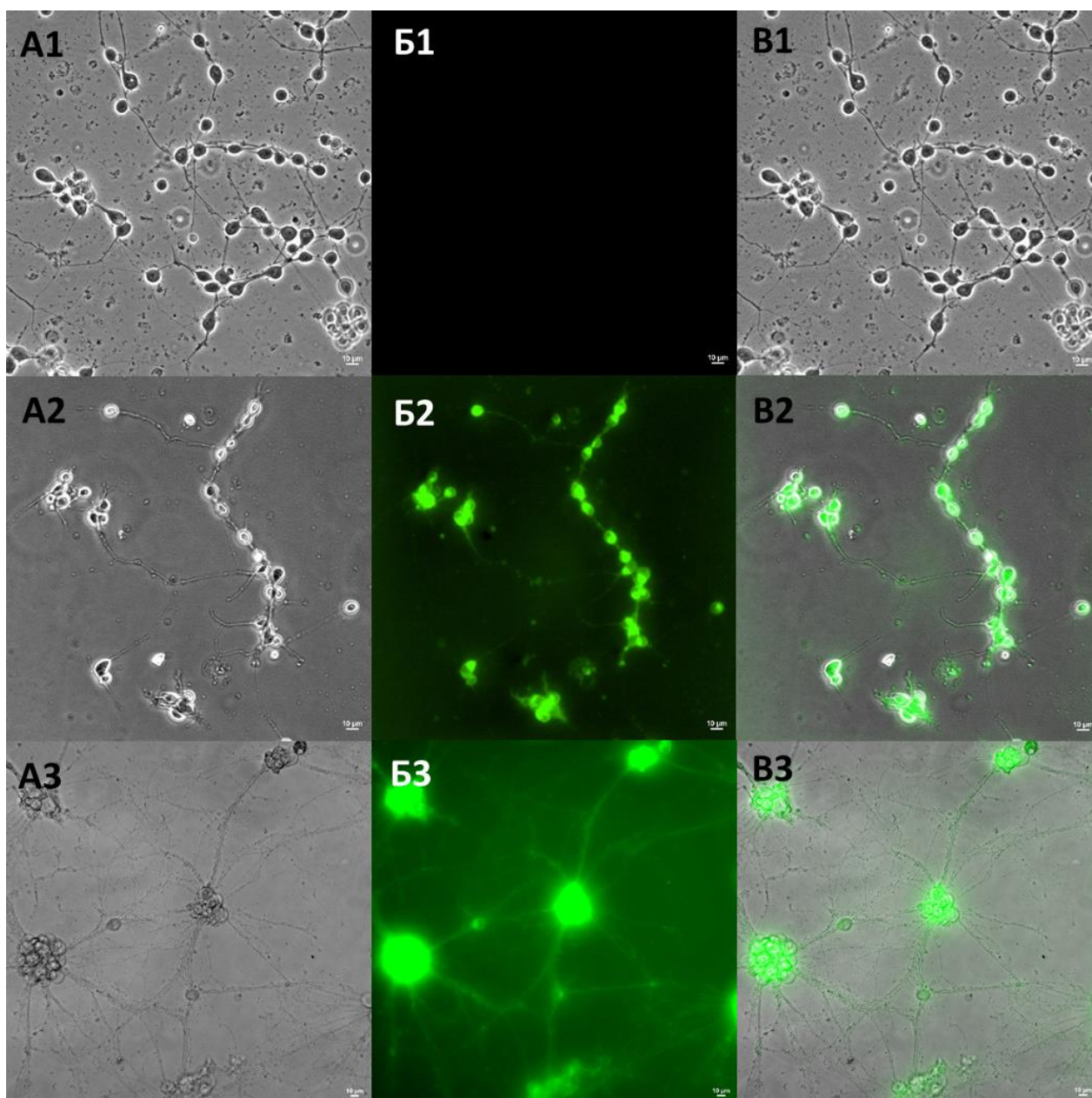
При одинаковой посевной дозе клеток на 1 DIV различий в росте нейронов на разных подложках практически не наблюдалось, нейроны прикрепилась достаточно равномерно и сформировали короткие нейриты. На рис. 1 показаны результаты фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии культуры клеток выращенной на разных подложках на 3 DIV. На снимках фазово-контрастной микроскопии (рис. 1 А) видно, что количество клеток на ГКТ-содержащей подложке значительно меньше, по сравнению с контрольной. При этом можно отметить укорочение и уменьшение количества нейритов у клеток в присутствии ГКТ.



**Рис. 1.** Микроскопические изображения нейронов на 3 DIV на покрытии из PDL (1) и PDL+ГКТ (2), где А – фазово-контрастная микроскопия клеток, Б – флуоресцентная микроскопия клеток,  $\lambda_{ex} = 470$  нм, В – совмещенные изображения флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии клеток

Анализ клеточной культуры первичных нейронов методом флуоресцентной микроскопии имеет ряд трудностей, связанных с наличием аутофлуоресценции клеток на длине волны 470 нм (т.е. данный сигнал будет перекрываться с сигналом люминесценции ГКТ). Наличие аутофлуоресценции может быть связано с накоплением липофусцина, пигмента старения нервных клеток, и рассеянием света липидными бислоями нейронов [9]. Полученные микрофотографии (рис. 1 Б) демонстрируют, что в контрольном образце преобладает сигнал аутофлуоресценции нейронов, в то время как в образце, содержащем ГКТ обнаружена равномерная фоновая люминесценция подложки. Накопления наночастиц клетками нервной ткани, растущими на поверхности, функционализированной ГКТ, зарегистрировано не было.

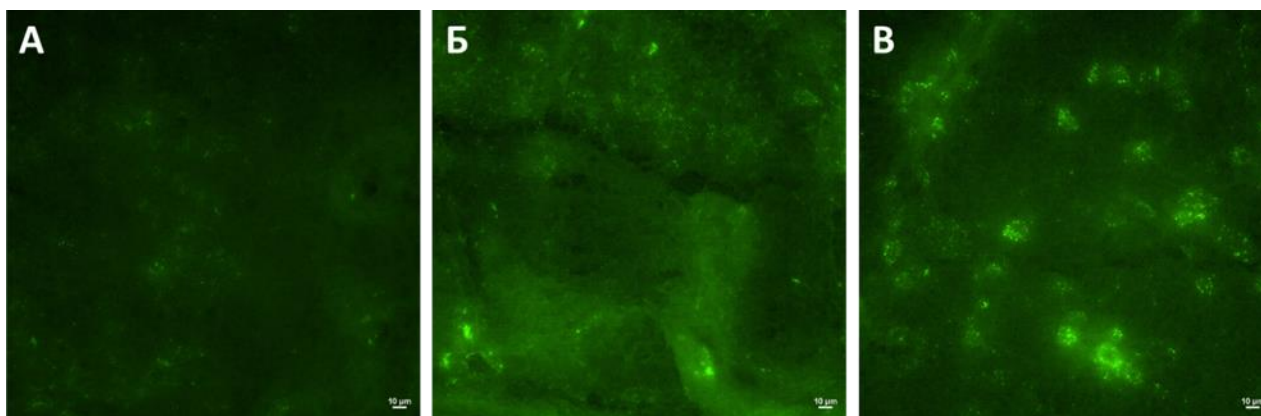
Также для оценки возможности накопления ГКТ клетками нервной ткани *in vitro* проводили инкубирование клеточной культуры на 3 и 5 DIV в среде PBS, содержащей ГКТ. Через 1 ч проводили флуоресцентный микроскопический анализ контрольного и исследуемых образцов, результаты которого представлены на рис. 2. В качестве контрольного образца была взята клеточная культура нейронов того же пассажа и той же посевной дозы, что и для исследуемых образцов. Из полученных данных следует, что флуоресценция визуализируется во всех клетках нервной ткани, присутствующих в образцах с ГКТ, свидетельствуя о неспецифическом накоплении данных флуоресцирующих наночастиц.



**Рис. 2.** Микроскопические изображения нейронов в контрольном (1) и инкубированных с ГКТ образцах на 3 DIV (2) и 5 DIV (3), где А – фазово-контрастная микроскопия клеток, Б – флуоресцентная визуализация ГКТ,  $\lambda_{\text{ex}} = 470$  нм, В – совмещенные изображения флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии клеток

При исследовании флуоресцентных изображений культуры клеток (рис. 2 Б) вычитался сигнал аутофлуоресценции клеток, и оценка интенсивности люминесценции ГКТ проводилась относительно контрольного образца, для исключения ложноположительных результатов анализа. Стоит отметить, что высокий выход флуоресценции ГКТ позволил визуализировать не только сомы (на 3 DIV) и кластеры (на 5 DIV) нейронов, но и нейриты. После 1 часа инкубации ГКТ с нейронами в концентрации 50 мкг/мл токсического действия на клетки не выявлено.

При исследовании накопления и флуоресценции ГКТ в нервной ткани крысы *in vivo* было выявлено, что уже через 5 часов после инъекции раствора ГКТ наночастицы визуализируются в поперечном срезе гиппокампа крысы (рис. 3). Интенсивность флуоресценции в исследуемых образцах была выше, чем в срезах мозга контрольных крыс. Более того, флуоресцентный сигнал ГКТ регистрировался и после 24 часов воздействия наночастиц, демонстрируя фотостабильность ГКТ в живом организме.



**Рис. 3.** Флуоресцентная микроскопия поперечных срезов гиппокампа крысы при интраназальном введении ГКТ, где А – контрольный образец, Б – образец после 5 часов воздействия ГКТ, В – образец после 24 часов воздействия ГКТ. Флуоресцентная визуализация ГКТ проводилась при облучении на длине волны  $\lambda_{ex} = 470$  нм

Стоит отметить, что также, как и при *in vitro* изучении накопления ГКТ клетками нервной ткани, анализ срезов мозга осложняется наличием сильной аутофлуоресценции, возникающей из-за разнообразия типов клеток, образующих нервную ткань, и накопления липофусцина в них, в ходе старения [10].

Представленное в данной работе исследование дополняет полученные нами ранее результаты о диффузии флуоресцентных ГКТ в ткани мозга [11] и свидетельствуют о применимости ГКТ в качестве средства визуализации структур нервной ткани и доставки конъюгированных препаратов, о перспективности дальнейших исследований механизмов накопления, взаимодействия, деградации и выведения ГКТ в биологических модельных системах *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, актуальной является разработка новых многофункциональных материалов на основе ГКТ для широкопрофильного применения – от фундаментальных исследований клеточных биологических процессов до контролируемой доставки лекарств, диагностики заболеваний и неинвазивной терапии.

#### Литература:

- [1]. *Shabani L.* et al. Neuro-nanotechnology: diagnostic and therapeutic nano-based strategies in applied neuroscience // *BioMed Eng OnLine.* – 2023. – Vol. 22. –P. 1–41.
- [2]. *Kim B.* et al. A brief review of non-invasive brain imaging technologies and the near-infrared optical bioimaging // *Appl. Microsc.* – 2021. – Vol. 51. – P. 1–9.
- [3]. *Nune S.K.* et al. Nanoparticles for biomedical imaging // *Expert Opin Drug Deliv.* – 2009. – Vol. 6. – P. 1175–1194.
- [4]. *Han X.* et al. Applications of nanoparticles in biomedical imaging // *Nanoscale.* – 2019. – Vol. 11. – P. 799-819.
- [5]. *Baldrighi M.* et al. Carbon nanomaterials interfacing with neurons: an *in vivo* perspective // *Front. Neurosci.* – 2016. – Vol. 10. – P. 1–27.
- [6]. *Shang W.* et al. The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells // *Nanoscale.* – 2014. – Vol. 6. – P. 5799–5806.
- [7]. *Perini G.* et al. Unravelling the potential of graphene quantum dots in biomedicine and neuroscience // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – P. 3712.
- [8]. *Li S.* et al. Transferrin conjugated nontoxic carbon dots for doxorubicin delivery to target pediatric brain tumor cells // *Nanoscale.* – 2016. – Vol. 8. – P. 16662–16669.
- [9]. *Schnell S.A., Staines W.A., Wessendorf M.W.* Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue // *J. Histochem. Cytochem.* – 1999. – Vol. 47. – P. 719–730.
- [10]. *Spitzer N., Sammons G.S., Price E.M.* Autofluorescent cells in rat brain can be convincing impostors in green fluorescent reporter studies // *J. Neurosci. Methods.* – 2011. – Vol. 197. – P. 48–55.
- [11]. *Денисов А.А. и др.* Диффузия графеновых квантовых точек в срезы гиппокампа крысы *in vitro* // *Новости медико-биологических наук.* – 2022. – Т.25, №4. – С 14-18.

*A.V. BAHDANAVA<sup>1,2</sup>, A.A. DENISOV<sup>2,3</sup>, T.A. KULAHAVA<sup>1</sup>, S.V. PASHKEVICH<sup>3</sup>*

**APPLICATION OF GRAPHENE QUANTUM DOTS FOR IN VITRO AND IN VIVO BIOIMAGING OF NERVOUS TISSUE CELLS**

<sup>1</sup> *Institute for Nuclear Problems of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup> *Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>3</sup> *Institute of Physiology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

**Summary**

The work examines the interaction of nervous tissue cells with graphene quantum dots. It was found that this nanomaterial doesn't have a cytotoxic effect on cells. The possibility of using graphene quantum dots for non-selective bioimaging of nervous tissue cells *in vitro* has been demonstrated. As a result of *in vivo* experiments, it was established that when administered intranasally, graphene quantum dots are capable of heterogeneous distribution and accumulation in the brain.

*Key words:* nervous tissue cells, graphene quantum dots, fluorescence microscopy.