



© 2023 Коллектив авторов, 2023

УДК 546.26-004.57

DOI: 10.24884/1607-4181-2022-30-3-48-57

Семёнов К. Н.^{1-3*}, Агеев С. В.^{1,3}, Юрьев Г. О.¹⁻³, Молчанов О. Е.², Майстренко Д. Н.², Самбук Е. В.³, Румянцев А. М.³, Мурин И. В.³, Шаройко В. В.¹⁻³

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, пос. Песочный, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ОКСИДА ГРАФЕНА КАК СПОСОБ УВЕЛИЧЕНИЯ БИОСОВМЕСТИМОСТИ

Поступила в редакцию 23.10.2023 г.; принята к печати 06.12.2023 г.

Резюме

Введение. В настоящий момент одним из наиболее перспективных направлений применения графенов и материалов на его основе, в частности оксида графена, является биомедицина. Благодаря большому разнообразию функциональных групп и возможности химического модифицирования оксида графена перспективным является создание композиционных материалов биомедицинского назначения. Данные наноматериалы обладают уникальной структурой и свойствами, что определяет их использование для создания систем адресной доставки лекарств, в тканевой инженерии, биовизуализации, а также для создания новых материалов, обладающих антимикробными и противовирусными свойствами.

Цель — осуществить синтез и идентификацию оксида графена и его конъюгата с глицином, а также исследовать биосовместимость полученных наноматериалов: влияние на гемолиз и агрегацию тромбоцитов, генотоксичность, цитотоксичность.

Методы и материалы. Оксид графена был синтезирован из графита по модифицированному методу Хаммерса и Оффемана, после чего также был получен конъюгат оксида графена с глицином. Идентификацию проводили с помощью ядерной магнитно-резонансной спектроскопии. Изучение биосовместимости полученных наноматериалов включало исследование их гемолитической активности, влияния на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов, цито- и генотоксичность.

Результаты. Были синтезированы оксид графена и его конъюгат с глицином. Идентификация с помощью ядерной магнитно-резонансной спектроскопии подтвердила строение и состав веществ. Результаты исследований биосовместимости полученных наноматериалов показали отсутствие гемолитической активности (степень гемолиза не превысила 2,5% в исследуемых диапазонах концентраций); наличие антиагрегантных свойств (при $C = 10 - 100 \text{ мкг/мл}$); отсутствие генотоксических и цитотоксических свойств (оксид графена при $C = 0,25 - 25 \text{ мкг/л}$ не влияет на жизнеспособность клеток линии НЕК293; в свою очередь, конъюгат с глицином при $C = 100 - 200 \text{ мкг/л}$ вызывает дозозависимое увеличение пролиферации клеток НЕК293).

Вывод. Таким образом, проведенные исследования демонстрируют, что функционализация поверхности графена кислородсодержащими группами и аминокислотами приводит к повышению гемосовместимости, а также получению наноматериалов, не проявляющих гено- и цитотоксичности.

Ключевые слова: оксид графена, цитотоксичность, генотоксичность, гемосовместимость, биосовместимость

Для цитирования: Семёнов К. Н., Агеев С. В., Юрьев Г. О., Молчанов О. Е., Майстренко Д. Н., Самбук Е. В., Румянцев А. М., Мурин И. В., Шаройко В. В. Функционализация оксида графена как способ увеличения биосовместимости. *Ученые записки ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова*. 2023; 30(3):48 – 57. DOI: 10.24884/1607-4181-2023-30-3-48-57.

* Автор для связи: Константин Николаевич Семёнов, ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И. П. Павлова Минздрава России, 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8. E-mail: semenov1986@yandex.ru.

Konstantin N. Semenov^{1-3*}, Sergey V. Ageev^{1,3}, Gleb O. Iurev¹⁻³, Oleg E. Molchanov², Dmitrii N. Maistrenko², Elena V. Sambuk³, Andrey M. Rumyantsev³, Igor V. Murin³, Vladimir V. Sharoyko¹⁻³

¹ Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

² A. M. Granov Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies, Saint Petersburg, Russia

³ Institute of Chemistry, St Petersburg University, Saint Petersburg, Russia

FUNCTIONALIZATION OF GRAPHENE OXIDE AS A WAY TO INCREASE BIOCOMPATIBILITY

Received 23.10.2023; accepted 06.12.2023

Summary

Introduction. Now, one of the most promising areas for the use of graphene-based materials, in particular graphene oxide, is biomedicine. Due to the wide variety of functional groups and the possibility of chemical modification of graphene oxide, the creation of composite materials for biomedical use is promising. These nanomaterials have a unique structure and properties, which determines their use for creating targeted drug delivery systems, in tissue engineering, bioimaging, as well as for creating new materials with antimicrobial and antiviral properties.

The **objective** was to perform synthesis and identification of graphene oxide and its conjugate with glycine, and to study the biocompatibility of the obtained nanomaterials: the effect on haemolysis and platelet aggregation, genotoxicity and cytotoxicity.

Methods and materials. Graphene oxide was synthesized from graphite using the modified Hummers and Offeman method, after which the graphene oxide-glycine conjugate was also obtained. Identification was carried out using nuclear magnetic resonance spectroscopy. Estimation of biocompatibility of the obtained nanomaterials included the study of their hemolytic activity, effect on collagen-induced platelet aggregation, cyto- and genotoxicity.

Results. Graphene oxide and its conjugate with glycine were synthesized. Identification with using nuclear magnetic resonance spectroscopy confirmed the structure and composition of the substances. The study of the biocompatibility of the obtained nanomaterials showed the absence of hemolytic activity (the degree of hemolysis did not exceed 2.5% at the studied concentration range); the presence of antiplatelet properties (at $C = 10 - 100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$); the absence of geno- and cytotoxicity (graphene oxide at $C = 0.25 - 25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ does not affect the viability of HEK293 cells; in turn, the conjugate with glycine at $C = 100 - 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ causes a dose-dependent increase proliferation of HEK293 cells).

Conclusion. The study demonstrates that functionalization of the graphene surface with oxygen-containing groups and amino acids leads to increased hemocompatibility, as well as to the production of nanomaterials that do not exhibit geno- and cytotoxicity.

Keywords: graphene oxide, cytotoxicity, genotoxicity, hemocompatibility, biocompatibility

For citation: Semenov K. N., Ageev S. V., Iurev G. O., Molchanov O. E., Maistrenko D. N., Sambuk E. V., Rumyantsev A. M., Murin I. V., Sharoyko V. V. Functionalization of graphene oxide as a way to increase biocompatibility. *The Scientific Notes of Pavlov University*. 2023;30(2):48–57. (In Russ.). DOI: 10.24884/1607-4181-2023-30-2-48-57.

* **Corresponding author:** Konstantin N. Semenov, Pavlov University, 6-8, L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, 197022, Russia. E-mail: semenov1986@yandex.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Графен — новый 2D-наноматериал толщиной в один атом, который представляет собой двумерную аллотропную модификацию углерода. Атомы углерода в графене находятся в состоянии sp^2 -гибридизации и соединены посредством σ - и π -связей в гексагональную двумерную кристаллическую решетку. Оксид графена (GO) представляет собой окисленную форму графена, которая содержит кислородные функциональные группы на поверхности графенового листа (карбонильные, карбоксильные, лактольные, гидроксильные и эпоксидные группы). Использование окисленной формы графена имеет следующие преимущества: возможность получения стабильных водных дисперсий; возможность проведения дальнейшей функционализации поверхности GO с использованием различных функциональных групп, расположенных на поверхности оксида графена (рис. 1).

Благодаря большому разнообразию функциональных групп и возможности химического модифицирования GO перспективным является со-

здание композиционных материалов биомедицинского назначения (рис. 2), например, для лечения онкологических заболеваний [1], средств доставки лекарств и биомолекул [2, 3], разработки биосенсоров [4], материалов с противовирусными [5], антибактериальными [6] и противогрибковыми свойствами [7], а также для доставки биомолекул, таких как ферменты [8, 9], белки [10–12], гены [13–15], РНК [16, 17] и ДНК [18, 19].

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

Синтез GO и GO-Gly. GO был синтезирован из графита по модифицированному методу Хаммерса и Оффемана (рис. 3). В круглодонной колбе смешивали 5 г графита, 0,5 г P_2O_5 и 25 мл H_2SO_4 и реакционную смесь обрабатывали в ультразвуковой бане (мощность ультразвука — 160 Вт) в течение 10 мин, далее перемешивали в течение 15 мин при комнатной температуре. После этого в систему постепенно добавляли 0,5 г $NaNO_3$ при охлаждении до 5 °С при непрерывном перемешивании в течение 30 мин. Далее добавляли 5 г

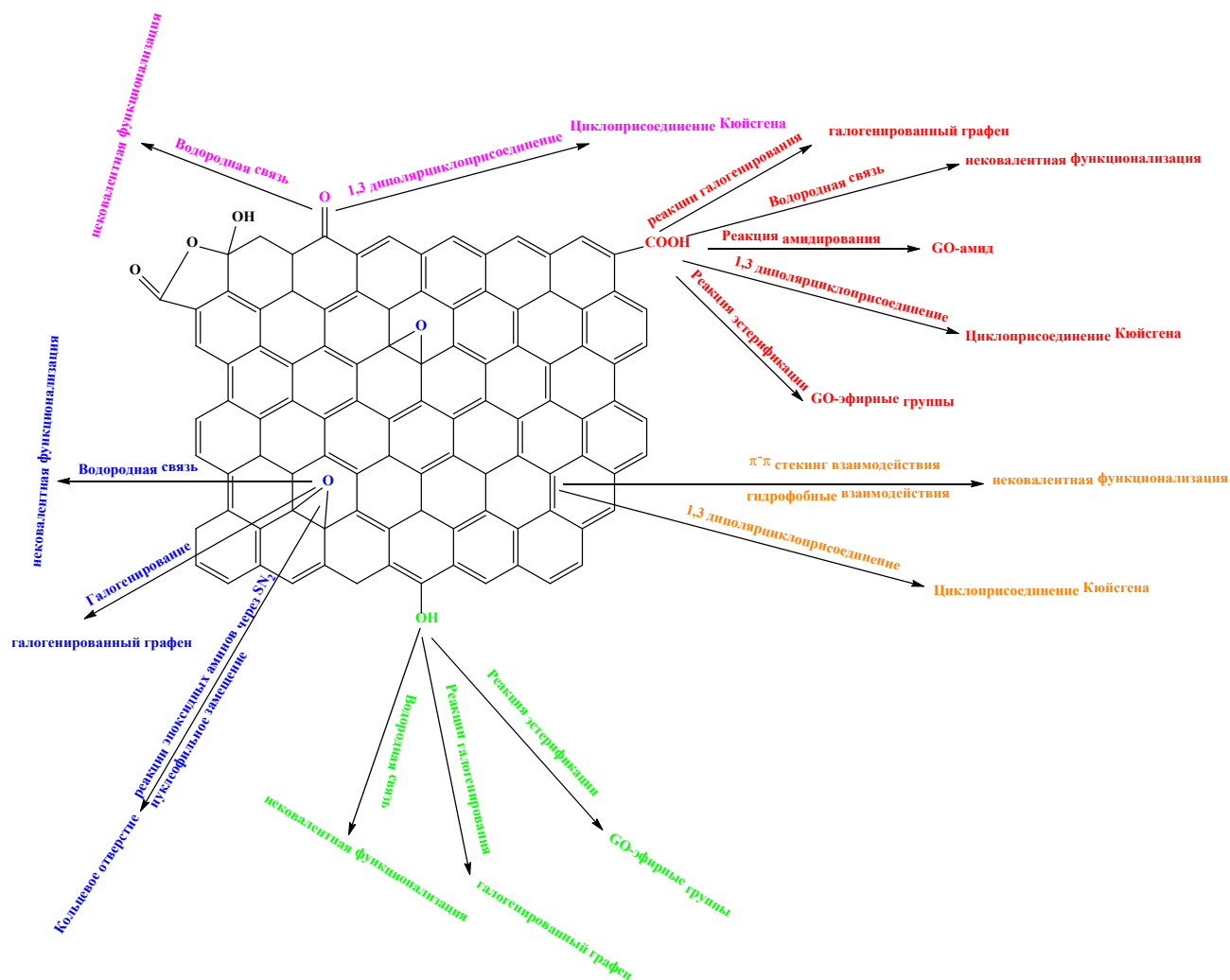


Рис. 1. Способы функционализации поверхности графена

Fig. 1. Methods of graphene surface functionalization

KMnO_4 при непрерывном перемешивании в течение 30 мин (температура поддерживалась при 5°C), а затем повышали температуру до 40°C в течение 1 часа при непрерывном перемешивании с последующим постепенным добавлением 12,5 мл дистиллированной воды. После этого температуру реакционной смеси повышали до 95°C на 1,5 часа, затем добавляли 25 мл дистиллированной воды и 0,5 мл H_2O_2 ($\omega = 30\%$). Полученный осадок отделяли от раствора с использованием фильтра Шотта (пористость — 10), промывали дистиллированной водой и разбавленной HCl ($\omega = 5\%$) до нейтрального значения pH, высушивали при 65°C и повторно диспергировали в дистиллированной воде в ультразвуковой бане в течение 1 часа.

Синтез GO-Gly осуществляли следующим образом: к дисперсии GO (100 мг) в диметилформамиде (ДМФА, $V = 5$ мл), добавляли тионилхлорид. Полученный GO — COCl , промывали хлористым метилом и сушили при 85°C в течение 5 часов. К дисперсии глицина ($m = 100$ мг) в ДМФА ($V = 15$ мл), добавляли GO — COCl , перемешивали при комнатной температуре в течение 72 часов, фильтровали, промывали метилхлоридом и де-

ионизированной водой, после чего сушили при 65°C в течение 10 часов (рис. 4). По данным элементного анализа загрузка Gly в GO-Gly составляет 15,75 масс. %.

Идентификация GO и GO-Gly. Идентификацию проводили с помощью твердотельной ЯМР спектроскопии (Bruker Advance III 400 WB; рабочая частота 100,64 МГц для ^{13}C).

Исследование биосовместимости GO и GO-Gly. Исследование биосовместимости включало изучение гемолиза, цито- и генотоксичности, влияния на агрегацию тромбоцитов образцов GO и GO-Gly.

Гемолиз и агрегация тромбоцитов. Для оценки биосовместимости GO и GO-Gly было изучено их влияние на спонтанный гемолиз и агрегацию тромбоцитов. В случае совместимых с кровью веществ мембрана эритроцитов остается неповрежденной, а содержимое клетки не высвобождается. Влияние исследуемого вещества на гемолиз определяли путем оценки высвобожденного гемоглобина. Степень гемолиза определяли по формуле:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{E_{\text{он}} - E_{\text{к}}}{E_{100}} \cdot 100, \quad (1)$$

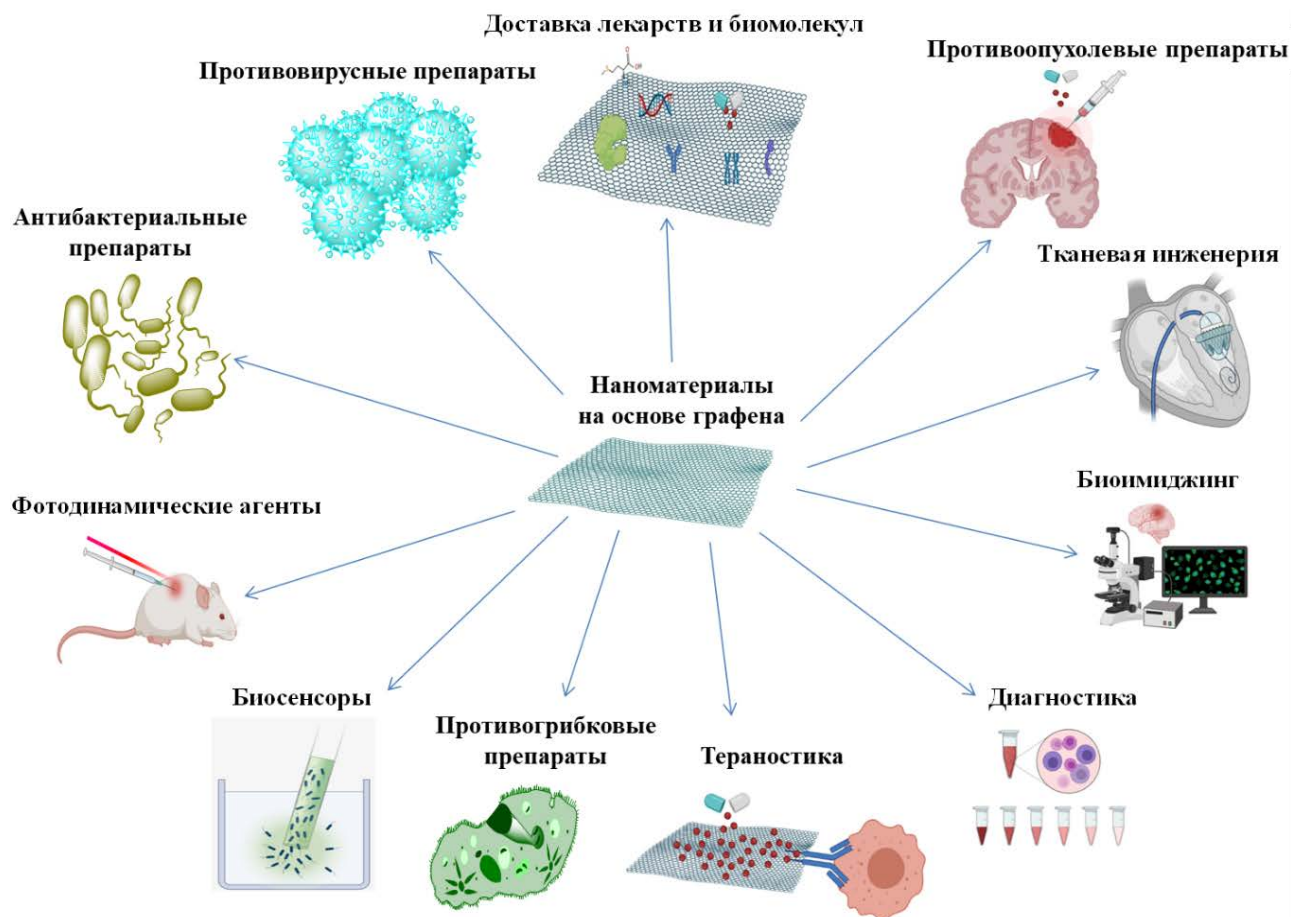


Рис. 2. Применение материалов на основе графена в нанобиомедицине
Fig. 2. Application of graphene-based materials in nanobiomedicine

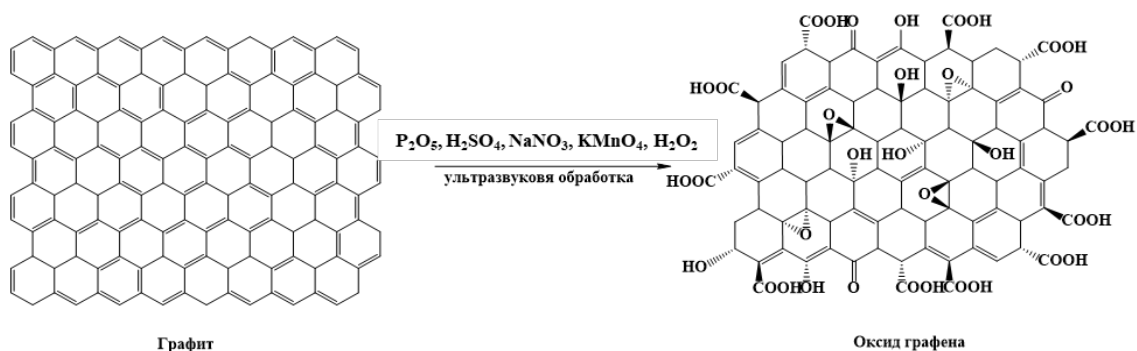


Рис. 3. Схема синтеза GO
Fig. 3. GO synthesis scheme

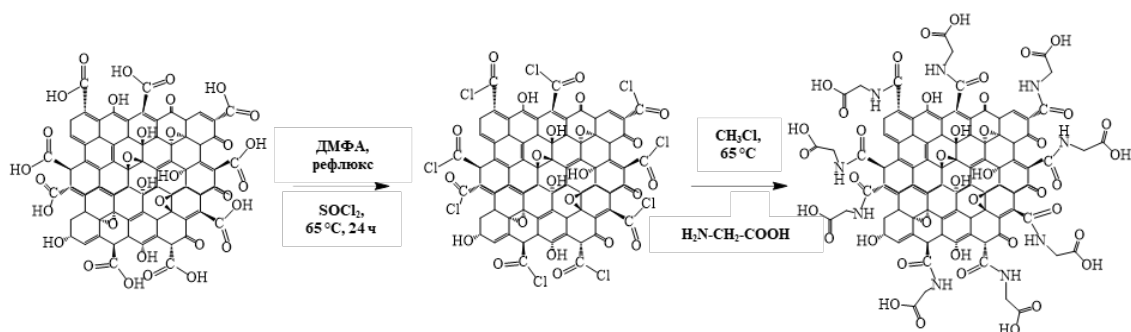


Рис. 4. Схема реакции синтеза GO-Gly
Fig. 4. GO-Gly synthesis reaction scheme

где $E_{\text{оп}}$ — оптическая плотность опытной пробы; $E_{\text{к}}$ — оптическая плотность контрольной пробы; E_{100} — оптическая плотность суспензии эритроцитов.

После получения информированного согласия образцы крови для исследования были взяты у 8 доноров обоих полов в возрасте 20–30 лет. Кровь отбирали в вакутейнеры, содержащие в качестве стабилизатора цитрат натрия ($C=0,129$). Исследование гемолиза проводили путем измерения М) в соотношении цитрат натрия: кровь — 1:9. Исследование гемолиза проводили путем измерения оптической плотности супернатантов при $\lambda = 540$ нм на спектрофотометре Thermo Scientific Evolution 300 (США). Реакционную смесь объемом 2 мл готовили из 1 мл дисперсии GO или GO-Gly с концентрацией $2,5–25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ и 1 мл суспензии эритроцитов в изотоническом растворе. После приготовления образцы инкубировали при $37 \pm 0,2$ °С в течение 1 и 3 часов. По окончании инкубации пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 6000 об/мин.

Для изучения влияния тестируемых веществ на индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов стабилизированную кровь центрифугировали в течение 7 мин при комнатной температуре и 1000 об/мин. Часть обогащенной тромбоцитами плазмы отбирали в пластиковую пробирку в количестве, необходимом для выполнения анализа. Из оставшейся крови центрифугированием получали бедную тромбоцитами плазму в течение 30 мин при 3600 об/мин. Бедная тромбоцитами плазма использовалась для калибровки агрегометра SolarAP 2110 (Беларусь). Плазму стандартизировали до получения концентрации тромбоцитов $2,0–2,5 \cdot 10^{11} \cdot \text{л}^{-1}$ с учетом добавления тестируемого вещества. Влияние GO и GO-Gly на индуцированную агрегацию тромбоцитов определяли, смешивая в кюветах 270 мкл плазмы и 30 мкл раствора исследуемого вещества при конечной концентрации $10–100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ соответственно. Коллаген вносили в кюветы через 5 мин после инкубации смеси. Агрегацию регистрировали до выхода кривой на плато [20].

Цитотоксичность. МТТ-тест (колориметрический тест с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) проводился на линии клеток HEK293 (клетки почки эмбриона человека) для измерения цитотоксичности GO и GO-Gly [40]. 5000 клеток на лунку высевали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение ночи в культуральной среде DMEM-F12, содержащей 10 % термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (FCS) и пенициллина-стрептомицина ($10 \text{ МЕ} \cdot \text{мл}^{-1}–100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$). В течение этого периода клетки прикреплялись к поверхности лунок. После этого в лунки добавляли свежую среду DMEM-F12, содержащую различные концентрации GO или GO-Gly, далее планшет помещали в CO_2 -инкубатор (влажность — 95 %, содержание CO_2 — 5 %, температура — 37 °С). Через 48 часов в лунки добавляли

100 мкл среды DMEM-F12 и 20 мкл МТТ-реагента ($0,5 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) и продолжали инкубировать в течение 1 часа. Затем супернатант удаляли, кристаллы формазана, образующиеся при восстановлении МТТ жизнеспособными клетками, растворяли в 0,1 мл диметилсульфоксида (ДМСО), и оптическую плотность измеряли на микропланшетном ридере ALLSHENG AMR-100T (Китай) при $\lambda = 540$ нм, вычитая фоновую оптическую плотность при $\lambda = 690$ нм. МТТ-тест проводился на линии клеток эмбриона почки человека (HEK293).

Генотоксичность. Генотоксический эффект GO и GO-Gly на ДНК оценивали *in vitro* с использованием плазмиды pBR322. Этот подход широко используется для оценки генотоксичности различных соединений [40]. В зависимости от конформации молекулы плазмидной ДНК движутся по-разному во время электрофореза в агарозном геле. Молекулы, находящиеся в сверхскрученном состоянии (спиральная спираль, SS), проходят дальше всего; молекулы, содержащие разрыв в одной нити, которые находятся в расслабленном состоянии (разомкнутая спираль, OC), мигрируют на меньшее расстояние; в середине перемещаются линейные молекулы, возникающие в результате разрыва в 2 нитях. Для изучения генотоксичности плазмиду pBR322 (Thermo Fisher Scientific, США) клонировали в бактериальном штамме *Escherichia coli* DH5 альфа и выделяли с помощью набора «Плазида MidiPrep» («Евроген», Россия). Концентрационный диапазон GO и GO-Gly составил $1–200 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$; образцы инкубировали в течение 15 часов при 37 °С и анализировали с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле. В итоговом эксперименте 20 мкл веществ добавлял к пробам «нативной» плазмидной ДНК объемом 5 мкл, содержащим фиксированную массу плазмиды — 500 нг. Пробы инкубировали 24 часа при 37 °С. После инкубации пробы анализировал с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация GO и GO-Gly. ^{13}C ЯМР-спектроскопия. В спектрах GO и GO-Gly (рис. 5) видны следующие сигналы: сигнал при 60 м. д. соответствует гидроксильным группам GO; сигнал при 69 м. д. относится к эпоксидным группам GO; сигнал при 98 м. д. соответствует атому углерода в карбоксильной группе GO; сигнал при 129 м. д. относится к структурному фрагменту $\text{C}=\text{C}$ плоскости GO; сигнал при 166 м. д. соответствует карбонильной группе в составе амидной связи конъюгата GO-Gly; сигнал при 191 м. д. соответствует карбоксильным группам GO. Процентное содержание кислородсодержащих групп на поверхности GO составляет 85 %.

Исследование биосовместимости GO и GO-Gly. На рис. 6 представлены зависимости степени гемо-

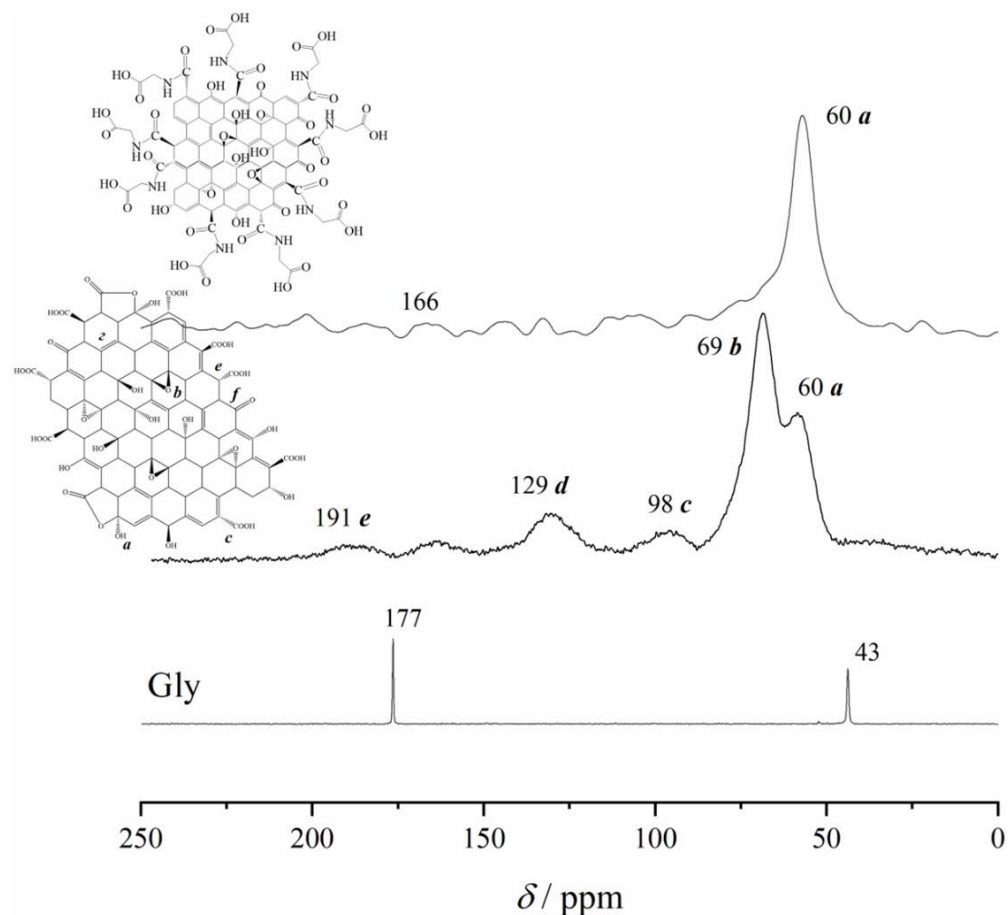


Рис. 5. ^{13}C ЯМР спектр GO и GO-Gly
Fig. 5. ^{13}C NMR spectrum of GO and GO-Gly

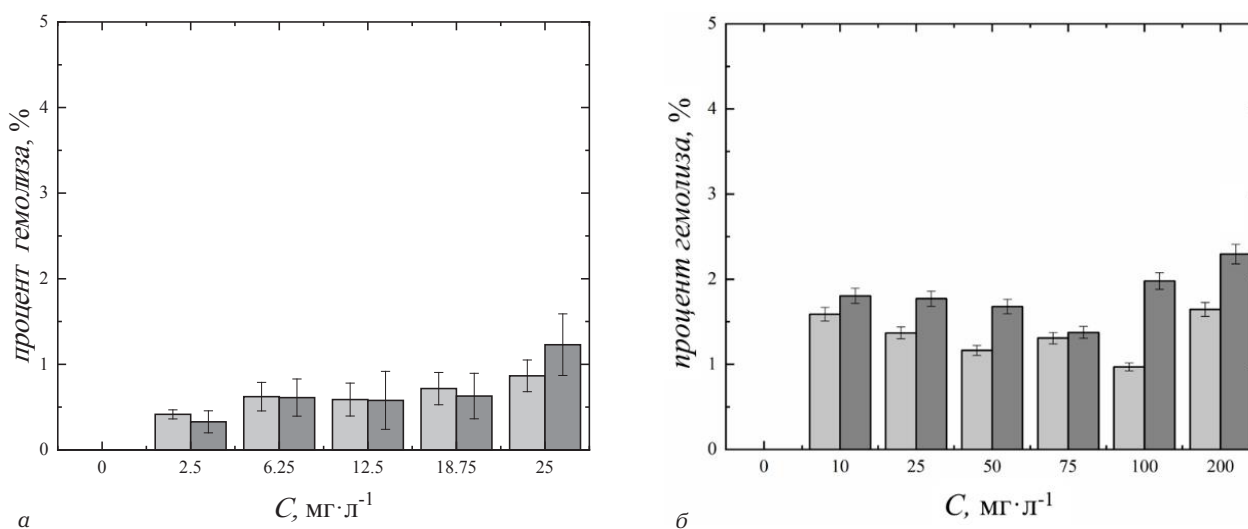


Рис. 6. Влияние GO (а) и GO-Gly (б) на гемолиз при инкубации в течение 1 (■) и 3 часов (■)
Fig. 6. Effect of GO (a) and GO-Gly (b) on hemolysis during incubation for 1 hour (■) and 3 hours (■)

лиза от концентрации GO и GO-Gly. Видно, что GO и GO-Gly после инкубации в течение 1 и 3 часов не вызывали гемолиза в изученном концентрационном диапазоне. Показано, что вещества являются гемосовместимыми, если степень гемолиза не превышает 5 % [21]. Анализ литературы показывает, что функционализация поверхности графена приводит к снижению гемолиза и, таким образом, к

повышению гемосовместимости. К. Н. Liao et al. (2011) [22] показал, что GO (обладает дозозависимой гемолитической активностью $TC_{50} = 20,2 - 49,6$ $\text{мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ (TC_{50} — концентрация вещества, которая вызывает гемолиз 50 % эритроцитов), при этом графен показал незначительный гемолиз ($TC_{50} > 200$ $\text{мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$). В то же время нековалентная функционализация GO хитозаном привела к отсутствию

Эффект GO и GO-Gly на индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов

Effect of GO and GO-Gly on collagen-induced platelet aggregation

Эффект	Амплитуда, %					
	C, мг·л ⁻¹					
	Контроль	10	25	50	75	100
GO	86,9±2,4	76,5±3,8*	72,2±2,4*	71,7 ±3,5*	70,1±4,5*	64,1±2,6*
GO-Gly	73,9±4,9	67,5±3,7	62,9±4,7*	60,8 ±3,4*	59,1±4,7*	51,3 ±2,5 *

* – p<0,05 в сравнении с контролем.

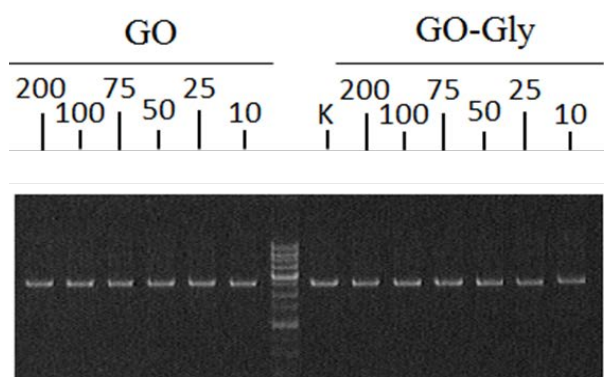


Рис. 7. Результаты электрофореза плазмидной ДНК pBR322 в присутствии GO и GO-Gly

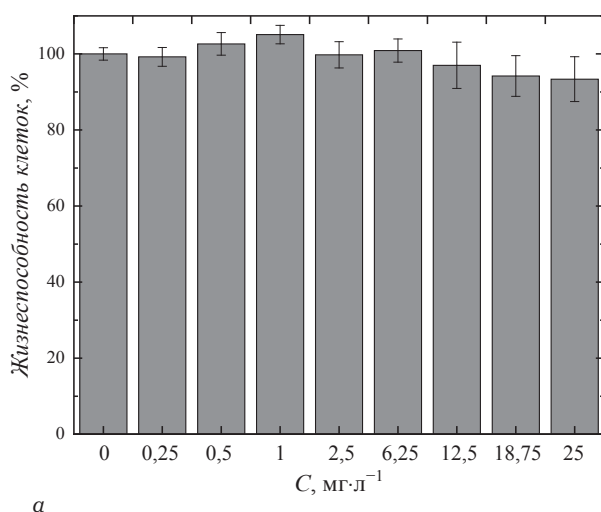
Fig. 7. Results of electrophoresis of plasmid DNA pBR322 in the presence of GO and GO-Gly

гемолитической активности. А. М. Pinto et al. (2016) [23] показал, что невалентная функционализация поверхности графена полимерами (поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, гидроксипропилцеллюлоза, хондроитин, глюкозамин и гиалуроновая кислота) приводит к снижению гемолиза до 1,7 % для всех материалов при концентрации, не превышающей 500 мкг·мл⁻¹. На кафедре общей и биоорганической химии было показано, что GO, функционализированный L-метионином (GFM) и L-цистеином (GFC), не вы-

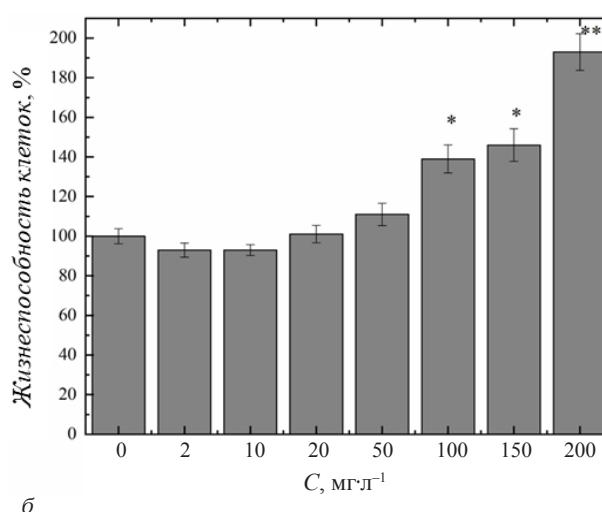
зывал повреждения мембраны эритроцитов при концентрации до 25 мкг·мл⁻¹ [24 – 26].

В таблице представлены данные по изучению влияния GO и GO-Gly (C = 10 – 100 мкг·л⁻¹) на коллаген-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Видно, что GO и GO-Gly обладают антиагрегантными свойствами. Напротив, авторы [27] установили, что GO с низким содержанием кислородсодержащих групп индуцирует агрегацию тромбоцитов.

Генотоксичность. После инкубации плазмидной ДНК с тестируемыми веществами были проанализированы изменения в ее конформации. Было показано, что GO и GO-Gly не вызывал разрывов в плазмидной ДНК в изученных условиях (рис. 7). Y. Liu et al. (2013) [28] показал, что GO в концентрации до 100 мкг·мл⁻¹ индуцирует мутагенез по причине влияния на репликацию ДНК и изменения экспрессии генов. P. Wang et al. (2013) [29] сообщили, что GO (до 100 мкг·мл⁻¹) обладает значительной генотоксичностью в отношении фибробластов легких человека из-за повреждения ДНК в результате генерации активных форм кислорода и наличия поверхностного заряда GO. Авторами было показано, что после функционализации поверхности GO с помощью PEG и лактобионовой кислоты генотоксичность значительно снизилась. На кафедре общей и биоорганической химии было



а



б

Рис. 8. Влияние GO (а) и GO-Gly (б) на жизнеспособность клеточной линии HEK293; *p<0,05 относительно контроля; **p<0,01 относительно контроля

Fig. 8. Effect of GO (a) and GO-Gly (б) on the viability of the HEK293 cell line; *p<0.05 relative to control; **p<0.01 relative to control

показано, что как GFM, так и GFC не проявляли генотоксичности до $C = 25 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$.

Цитотоксичность. Было установлено, что GO в концентрационном диапазоне ($C = 0,25 - 25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) не влияет на жизнеспособность клеток линии НЕК293 (рис. 8). На основании изучения цитотоксичности GO-Gly установлено, что полученный материал практически не оказывал влияния на пролиферативную активность клеточной линии НЕК293 при $C = 2 - 50 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, в свою очередь, при $C = 100 - 200 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ наблюдается дозозависимое увеличение пролиферации клеток НЕК293. Этот факт указывает на перспективность использования данного материала в регенеративной медицине и тканевой инженерии. Y. Wang et al. (2014) [30] показал, что GO ($C = 10 - 200 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) вызывал дозозависимую цитотоксичность в отношении клеток множественной миеломы человека RPMI 8226 через механизм окислительного стресса. O. Akhavan et al. (2012) [31] показал, что цитотоксичность графена зависит от размера наноматериала и его концентрации. J. Sun et al. (2016) [32] показал, что функционализация поверхности графена гидроксильными группами не влияет на жизнеспособность стромальных клеток, полученных из жировой ткани крысы (rADSCs). H. Wu et al. (2014) [33] продемонстрировали, что GO, ковалентно функционализированный дигидразидом адипиновой кислоты и гиалуроновой кислотой, не оказывает цитотоксического эффекта на клеточные линии HeLa и L929 до $C = 200 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Кроме того, GFM, GFC, и GO (с высоким содержанием кислородсодержащих групп) не проявляли цитотоксичности по отношению к клеточной линии НЕК293 до $C = 25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ [24, 26, 34].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе представлена методика синтеза GO из графита, приводящая к получению наноматериала до 85 % обогащенного кислородсодержащими группами (карбоксильными, лактольными, эпоксидными, карбонильными, гидроксильными). Также представлена стратегия ковалентной функционализации GO на примере глицина. В результате проведенного исследования установлено, что функционализация поверхности GO кислородсодержащими группами и аминокислотами приводит к повышению гемосовместимости, а также получению наноматериалов, не проявляющих гено- и цитотоксичности.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest

Соответствие нормам этики

Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получе-

ние информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо, и правила обращения с животными в случаях их использования в работе. Подробная информация содержится в Правилах для авторов.

Compliance with ethical principles

The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary, and the rules of treatment of animals when they are used in the study. Author Guidelines contains the detailed information.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения РФ. Наименование проекта: «Разработка молекулярного дизайна и создание препаратов на основе конъюгатов углеродных наноструктур, векторов адресной доставки и цитотоксических агентов для инактивации стволовых опухолевых клеток и компонентов микроокружения опухоли», ЕГИСУ: 123021300231-8.

Financing

The work was carried out with the support of the Ministry of Health of the Russian Federation. Project name: «Development of molecular design and creation of drugs based on conjugates of carbon nanostructures, targeted delivery vectors and cytotoxic agents for inactivation of tumor stem cells and components of the tumor microenvironment», USAIS: 123021300231-8.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eskiizmir G., Baskin Y., Yapici K. Graphene-based nanomaterials in cancer treatment and diagnosis // Fullerenes, Graphenes and Nanotubes: A Pharmaceutical Approach. – 2018. – P. 331–74.
2. Wang H., Gu W., Xiao N. et al. Chlorotoxin-conjugated graphene oxide for targeted delivery of an anticancer drug // Int J Nanomedicine. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 1433–42.
3. Kim H., Namgung R., Singha K. et al. Graphene oxide-polyethylenimine nanoconstruct as a gene delivery vector and bioimaging tool // Bioconj Chem. – 2011. – Vol. 22, № 12. – P. 2558–67.
4. Lee J., Kim J., Kim S., Min D. H. Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – Vol. 105. – P. 275–87.
5. Innocenzi P., Stagi L. Carbon-based antiviral nanomaterials: Graphene, C-dots, and fullerenes. A perspective // Chem Sci. – 2020. – Vol. 11, № 26. – P. 6606–22.
6. Szunerits S., Boukherroub R. Antibacterial activity of graphene-based materials // Journal of Materials Chemistry B. Royal Society of Chemistry. – 2016. – Vol. 4. – P. 6892–912.
7. Li C., Wang X., Chen F. et al. The antifungal activity of graphene oxide-silver nanocomposites // Biomaterials. – 2013. – Vol. 34, № 15. – P. 3882–90.
8. Zhang J., Zhang J., Zhang F. et al. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization // Langmuir. – 2010. – Vol. 26, № 9. – P. 6083–5.
9. Hermanová S., Zarevúcká M., Bouša D. et al. Graphene oxide immobilized enzymes show high thermal and solvent stability // Nanoscale. – 2015. – Vol. 7, № 13. – P. 5852–8.
10. Li H., Fierens K., Zhang Z. et al. spontaneous protein adsorption on graphene oxide nanosheets allowing efficient intracellular vaccine protein delivery // ACS Appl Mater Interfaces. – 2016. – Vol. 8, № 2. – P. 1147–55.
11. Kavitha T., Kang I. K., Park S. Y. Poly(acrylic acid)-grafted graphene oxide as an intracellular protein carrier // Langmuir. – 2014. – Vol. 30, № 1. – P. 402–9.

12. Emadi F., Amini A., Gholami A. Functionalized graphene oxide with chitosan for protein nanocarriers to protect against enzymatic cleavage and retain collagenase activity // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 42258. DOI: 10.1038/srep42258.
13. Zhao H., Ding R., Zhao X. et al. Graphene-based nanomaterials for drug and/or gene delivery, bioimaging, and tissue engineering // *Drug Discovery Today.* – 2017. – Vol. 22. – P. 1302–17.
14. Paul A., Hasan A., Kindi H. A. et al. Injectable graphene oxide/hydrogel-based angiogenic gene delivery system for vasculogenesis and cardiac repair // *ACS Nano.* – 2014. – Vol. 8, № 8. – P. 8050–62.
15. Chen B., Liu M., Zhang L. et al. Polyethylenimine-functionalized graphene oxide as an efficient gene delivery vector // *J Mater Chem.* – 2011. – Vol. 21, № 21. – P. 7736–41.
16. Imani R., Shao W., Taherkhani S. et al. Dual-functionalized graphene oxide for enhanced siRNA delivery to breast cancer cells // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* – 2016. – Vol. 147. – P. 315–25.
17. Yue H., Zhou X., Cheng M., Xing D. Graphene oxide-mediated Cas9/sgRNA delivery for efficient genome editing // *Nanoscale.* – 2018. – Vol. 10, № 3. – P. 1063–71.
18. Tang Z., Wu H., Cort J. R. et al. Constraint of DNA on functionalized graphene improves its biostability and specificity // *Small.* – 2010. – Vol. 6, № 11. – P. 1205–9.
19. Lu C. H., Zhu C. L., Li J. et al. Using graphene to protect DNA from cleavage during cellular delivery // *Chem Commun.* – 2010. – Vol. 46, № 18. – P. 3116–8.
20. Gaponenko I. N., Ageev S. V., Iurev G. O. et al. Biological evaluation and molecular dynamics simulation of water-soluble fullerene derivative C60[C(COOH)2]3 // *Toxicol Vitro.* – 2020. – Vol. 62. – P. 104683.
21. Huang Z. R., Hua S. C., Yang Y. L., Fang J. Y. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion // *Acta Pharmacol Sin.* – 2008. – Vol. 29, № 9. – P. 1094–102.
22. Liao K. H., Lin Y. S., MacOsco C. W., Haynes C. L. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts // *ACS Appl Mater Interfaces.* – 2011. – Vol. 3, № 7. – P. 2607–15.
23. Pinto A. M., Moreira J. A., Magalhães F. D., Gonçalves I. C. Polymer surface adsorption as a strategy to improve the biocompatibility of graphene nanoplatelets // *Colloids Surf B Biointerfaces.* – 2016. – Vol. 146. – P. 818–24.
24. Abdelhalim A. O. E., Sharoyko V. V., Meshcheriakov A. A. et al. Synthesis, characterisation and biocompatibility of graphene–L-methionine nanomaterial // *J Mol Liq.* – 2020. – Vol. 314. – P. 113605.
25. Abdelhalim A. O. E., Sharoyko V. V., Ageev S. V. et al. Graphene oxide of extra high oxidation: a wafer for loading guest molecules // *J Phys Chem Lett.* – 2021. – Vol. 12, № 41. – P. 10015–24.
26. Abdelhalim A. O. E., Sharoyko V. V., Meshcheriakov A. A. et al. Reduction and functionalization of graphene oxide with L-cysteine: Synthesis, characterization and biocompatibility // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* – 2020. – Vol. 29. – P. 102284.
27. Singh S. K., Singh M. K., Nayak M. K. et al. Thrombus inducing property of atomically thin graphene oxide sheets // *ACS Nano.* – 2011. – Vol. 5, № 6. – P. 4987–96.
28. Liu Y., Luo Y., Wu J. et al. Graphene oxide can induce in vitro and in vivo mutagenesis // *Sci Rep.* – 2013. – Vol. 3. – P. 3469.
29. Wang A., Pu K., Dong B. et al. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity and genotoxicity of graphene oxide towards human lung fibroblast cells // *J Appl Toxicol.* – 2013. – Vol. 33, № 10. – P. 1156–64.
30. Wang Y., Wu S., Zhao X. et al. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on human RPMI 8226 cells // *Bio-Medical Materials and Engineering.* – IOS Press, 2014. – Vol. 24, № 6. – P. 2007–13.
31. Akhavan O., Ghaderi E., Akhavan A. Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells // *Biomaterials.* – 2012. – Vol. 33, № 32. – P. 8017–25.
32. Sun J., Deng Y., Li J. et al. A new graphene derivative: hydroxylated graphene with excellent biocompatibility // *ACS Appl Mater Interfaces.* – 2016. – Vol. 8, № 16. – P. 10226–33.
33. Wu H., Shi H., Wang Y. et al. Hyaluronic acid conjugated graphene oxide for targeted drug delivery // *Carbon N Y.* – 2014. – Vol. 69. – P. 379–89.
34. Abdelhalim A. O. E., Meshcheriakov A. A., Maistrenko D. N. Graphene oxide enriched with oxygen-containing groups: on the way to an increase of antioxidant activity and biocompatibility // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* – 2022. – Vol. 210. – P. 112232.

REFERENCES

1. Eskiizmir G., Baskin Y., Yapici K. Graphene-based nanomaterials in cancer treatment and diagnosis // *Fullerenes, Graphenes and Nanotubes: A Pharmaceutical Approach.* 2018:331–74.
2. Wang H., Gu W., Xiao N. et al. Chlorotoxin-conjugated graphene oxide for targeted delivery of an anticancer drug // *Int J Nanomedicine.* 2014;9(1):1433–42.
3. Kim H., Namgung R., Singha K. et al. Graphene oxide-polyethylenimine nanoconstruct as a gene delivery vector and bioimaging tool // *Bioconjug Chem.* 2011;22(12):2558–67.
4. Lee J., Kim J., Kim S., Min D. H. Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application // *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2016;105:275–87.
5. Innocenzi P., Stagi L. Carbon-based antiviral nanomaterials: Graphene, C-dots, and fullerenes. A perspective // *Chem Sci.* 2020;11(26):6606–22.
6. Szunerits S., Boukherroub R. Antibacterial activity of graphene-based materials // *Journal of Materials Chemistry B.* Royal Society of Chemistry. 2016;4:6892–912.
7. Li C., Wang X., Chen F. et al. The antifungal activity of graphene oxide-silver nanocomposites // *Biomaterials.* 2013;34(15):3882–90.
8. Zhang J., Zhang J., Zhang F. et al. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization // *Langmuir.* 2010;26(9):6083–5.
9. Hermanová S., Zarevúcká M., Bouša D. et al. Graphene oxide immobilized enzymes show high thermal and solvent stability // *Nanoscale.* 2015;7(13):5852–8.
10. Li H., Fierens K., Zhang Z. et al. Spontaneous protein adsorption on graphene oxide nanosheets allowing efficient intracellular vaccine protein delivery // *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016;8(2):1147–55.
11. Kavitha T., Kang I. K., Park S. Y. Poly(acrylic acid)-grafted graphene oxide as an intracellular protein carrier // *Langmuir.* 2014;30(1):402–9.
12. Emadi F., Amini A., Gholami A. Functionalized graphene oxide with chitosan for protein nanocarriers to protect against enzymatic cleavage and retain collagenase activity // *Sci Rep.* 2017;7:42258. DOI: 10.1038/srep42258.
13. Zhao H., Ding R., Zhao X. et al. Graphene-based nanomaterials for drug and/or gene delivery, bioimaging, and tissue engineering // *Drug Discovery Today.* 2017;22:1302–17.
14. Paul A., Hasan A., Kindi H. A. et al. Injectable graphene oxide/hydrogel-based angiogenic gene delivery system for vasculogenesis and cardiac repair // *ACS Nano.* 2014;8(8):8050–62.
15. Chen B., Liu M., Zhang L. et al. Polyethylenimine-functionalized graphene oxide as an efficient gene delivery vector // *J Mater Chem.* 2011;21(21):7736–41.

16. Imani R., Shao W., Taherkhani S. et al. Dual-functionalized graphene oxide for enhanced siRNA delivery to breast cancer cells // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016;147:315–25.
17. Yue H., Zhou X., Cheng M., Xing D. Graphene oxide-mediated Cas9/sgRNA delivery for efficient genome editing // *Nanoscale*. 2018;10(3):1063–71.
18. Tang Z., Wu H., Cort J. R. et al. Constraint of DNA on functionalized graphene improves its biostability and specificity // *Small*. 2010;6(11):1205–9.
19. Lu C. H., Zhu C. L., Li J. et al. Using graphene to protect DNA from cleavage during cellular delivery // *Chem Commun*. 2010;46(18):3116–8.
20. Gaponenko I. N., Ageev S. V., Iurev G. O. et al. Biological evaluation and molecular dynamics simulation of water-soluble fullerene derivative C60[C(COOH)2]3 // *Toxicol Vitro*. 2020;62:104683.
21. Huang Z. R., Hua S. C., Yang Y. L., Fang J. Y. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion // *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29(9):1094–102.
22. Liao K. H., Lin Y. S., MacOsco C. W., Haynes C. L. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts // *ACS Appl Mater Interfaces*. 2011;3(7):2607–15.
23. Pinto A. M., Moreira J. A., Magalhães F. D., Gonçalves I. C. Polymer surface adsorption as a strategy to improve the biocompatibility of graphene nanoplatelets // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;146:818–24.
24. Abdelhalim A. O. E., Sharoyko V. V., Meshcheriakov A. A. et al. Synthesis, characterisation and biocompatibility of graphene–L-methionine nanomaterial // *J Mol Liq*. 2020;314:113605.
25. Abdelhalim A. O. E., Sharoyko V. V., Ageev S. V. et al. Graphene Oxide of Extra High Oxidation: A Wafer for Loading Guest Molecules // *J Phys Chem Lett*. 2021;10015–24.
26. Abdelhalim A. O. E., Sharoyko V. V., Meshcheriakov A. A. et al. Reduction and functionalization of graphene oxide with L-cysteine: Synthesis, characterization and biocompatibility // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2020;29:102284.
27. Singh S. K., Singh M. K., Nayak M. K. et al. Thrombus inducing property of atomically thin graphene oxide sheets // *ACS Nano*. 2011;5(6):4987–96.
28. Liu Y., Luo Y., Wu J. et al. Graphene oxide can induce in vitro and in vivo mutagenesis // *Sci Rep*. 2013;3:3469.
29. Wang A., Pu K., Dong B. et al. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity and genotoxicity of graphene oxide towards human lung fibroblast cells. 2013; 33(10):1156–64.
30. Wang Y., Wu S., Zhao X. et al. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on human RPMI 8226 cells // *Bio-Medical Materials and Engineering*. IOS Press, 2014:2007–13.
31. Akhavan O., Ghaderi E., Akhavan A. Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells // *Biomaterials*. 2012;33(32):8017–25.
32. Sun J., Deng Y., Li J. et al. A new graphene derivative: hydroxylated graphene with excellent biocompatibility // *T. Appl Topicol*. 2016;8(16):10226–33.
33. Wu H., Shi H., Wang Y. et al. Hyaluronic acid conjugated graphene oxide for targeted drug delivery // *Carbon N Y*. 2014;69:379–89.
34. Abdelhalim A. O. E., Meshcheriakov A. A., Maistrenko D. N. Graphene oxide enriched with oxygen-containing groups: on the way to an increase of antioxidant activity and biocompatibility // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2022; 210:112232.

Информация об авторах

Семёнов Константин Николаевич, доктор химических наук, профессор кафедры общей и биорганической химии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-2239-2044; **Агеев Сергей Вадимович**, специалист по учебно-методической работе, заведующий учебной частью кафедры общей и биорганической химии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-2709-7282; **Юрьев Глеб Олегович**, кандидат химических наук, доцент кафедры общей и биорганической химии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-3330-6324; **Молчанов Олег Евгеньевич**, доктор медицинских наук, руководитель отдела фундаментальных исследований, Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова (Санкт-Петербург, пос. Песочный, Россия), ORCID: 0000-0003-3882-1720; **Майстренко Дмитрий Николаевич**, доктор медицинских наук, Директор, Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова (Санкт-Петербург, пос. Песочный, Россия), ORCID: 0000-0001-8174-7461; **Самбук Елена Викторовна**, доктор биологических наук, доцент, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-0837-0498; **Румянцев Андрей Михайлович**, кандидат биологических наук, научный сотрудник, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-1744-3890; **Мурин Игорь Васильевич**, доктор химических наук, профессор, кафедра Химии твердого тела, Санкт-Петербургский государственный университет (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-1869-7590; **Шаройко Владимир Владимирович**, доктор биологических наук, профессор кафедры общей и биорганической химии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-3717-0471.

Information about authors

Semenov Konstantin N., Dr. of Sci. (Chem.), Professor of the Department of General and Bioorganic Chemistry, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-2239-2044; **Ageev Sergei V.**, Teaching and Learning Specialist of the Department of General and Bioorganic Chemistry, Head of the Educational Department of the Department of General and Bioorganic Chemistry, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-2709-7282; **Iuriev Gleb O.**, Cand. of Sci. (Chem.), Associate Professor of the Department of General and Bioorganic Chemistry, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-3330-6324; **Molchanov Oleg E.**, Dr. of Sci. (Med.), Chief Executive of the Fundamental Research Department, A. M. Granov Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-3882-1720; **Maystrenko Dmitrii N.**, Dr. of Sci. (Med.), Director, A. M. Granov Russian Research Centre for Radiology and Surgical Technologies, (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0001-8174-7461; **Sambuk Elena V.**, Dr. of Sci. (Biol.), Associate Professor of the Department of Genetics and Biotechnology, St Petersburg University, (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-0837-0498; **Rumyantsev Andrei M.**, Cand. of Sci. (Biol.), Research Fellow, Department of Genetics and Biotechnology, Saint-Petersburg State University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-1744-3890; **Murin Igor V.**, Dr. of Sci. (Chem.), Professor, Department of Solid State Chemistry, Saint-Petersburg State University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-1869-7590; **Sharoyko Vladimir V.**, Dr. of Sci. (Biol.), Professor of the Department of General and Bioorganic Chemistry, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-3717-0471.