

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ЛЮМИНОЛ-ЗАВИСИМУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

**Бочкова М.С., Тимганова В.П., Храмцов П.В., Ужвиюк С.В.,
Шардина К.Ю., Нечаев А.И., Раев М.Б., Заморина С.А.**

*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал
ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук,
г. Пермь, Россия*

Резюме. Графен и его производные все чаще используются в биомедицинских исследованиях, поэтому в настоящее время усиленно изучаются механизмы и последствия взаимодействия наночастиц графена с живыми объектами. Иммунная система участвует в защите организма человека и регуляции его функций, поэтому вопрос о воздействии графена и его производных на иммунные клетки является принципиальным. Специфическим ответом моноцитов, макрофагов и нейтрофилов на стимул или раздражитель является увеличение продукции активных форм кислорода (АФК). Поскольку литературные данные по влиянию оксида графена (ОГ) и пегилированного оксида графена (ОГ-ПЭГ) на лейкоциты периферической крови немногочисленны и противоречивы, ввиду использования разных концентрации частиц, разных условий и различных объектов исследования, представлялось важным оценить влияние ОГ и ОГ-ПЭГ на продукцию АФК лейкоцитами человека.

Целью нашего исследования явилось изучение влияния частиц немодифицированного и модифицированного ПЭГ оксида графена на продукцию АФК лейкоцитами периферической крови в тесте спонтанной и стимулированной люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Стимуляцию продукции АФК осуществляли опсонизированным зимозаном (ОЗ). Для оценки самостоятельного эффекта наночастиц на тушение люминесценции использовали бесклеточную систему с люминолом и перекисью водорода. В работе использовали наночастицы ОГ (Ossila, Великобритания), с поверхностью, модифицированной ПЭГ (ОГ-ПЭГ). Средний размер пластин ОГ составлял 1-5 мкм, ОГ-ПЭГ после модификации 569 ± 14 нм, количество покрывающего ПЭГ ~ 20%. Наночастицы применяли в концентрациях 5; 2,5; 1,25 мкг/мл.

Установлено, что наночастицы ОГ-ПЭГ в концентрациях 2,5 и 5 мкг/мл угнетали продукцию АФК в спонтанном варианте ЛЗХЛ, в то время как эффекты ОГ демонстрировали видимую, но не достоверную тенденцию к угнетению ЛЗХЛ. Аналогичные результаты были получены в стимулированном варианте ЛЗХЛ. Однако при анализе процесса в кинетике продукцию АФК снижали как ОГ-ПЭГ, так

Адрес для переписки:

*Бочкова Мария Станиславовна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: krasnykh-m@mail.ru*

Address for correspondence:

*Bochkova Maria S.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (342) 280-77-94.
Fax: 7 (342) 280-92-11.
E-mail: krasnykh-m@mail.ru*

Образец цитирования:

*М.С. Бочкова, В.П. Тимганова, П.В. Храмцов,
С.В. Ужвиюк, К.Ю. Шардина, А.И. Нечаев, М.Б. Раев,
С.А. Заморина «Изучение влияния наночастиц оксида
графена на люминол-зависимую хемилюминесценцию
лейкоцитов человека» // Медицинская иммунология,
2020. Т. 22, № 5. С. 977-986.
doi: 10.15789/1563-0625-SOT-2051*

© Бочкова М.С. и соавт., 2020

For citation:

*M.S. Bochkova, V.P. Timganova, P.V. Khramtsov,
S.V. Uzhviyuk, K.Yu. Shardina, A.I. Nechaev, M.B. Raev,
S.A. Zamorina "Study of the graphene oxide nanoparticles
effect on luminol-dependent chemiluminescence of human
leukocytes", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 977-986.
doi: 10.15789/1563-0625-SOT-2051*

DOI: 10.15789/1563-0625-SOT-2051

и ОГ, преимущественно в первые минуты теста. При анализе эффекта тушения люминесценции в бесклеточной системе достоверного влияния наночастиц ОГ и ОГ-ПЭГ выявлено не было.

Таким образом, общий вектор полученных эффектов был связан с подавлением продукции АФК. Депрессивные эффекты ОГ-ПЭГ на продукцию АФК лейкоцитами были более выраженными в сравнении с немодифицированным ОГ. В целом нами были подтверждены антиоксидантные эффекты ОГ и ОГ-ПЭГ при помощи метода ЛЗХЛ. Можно предположить, что, помимо собственно антиоксидантного эффекта наночастиц графена, продукция АФК снижается вследствие быстрого поглощения ОГ и блокирования ряда внутриклеточных сигналов, индуцирующих респираторный взрыв.

Ключевые слова: оксид графена, полиэтиленгликоль, люминол-зависимая хемилюминесценция, лейкоциты, активные формы кислорода

STUDY OF THE GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES EFFECT ON LUMINOL-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE OF HUMAN LEUKOCYTES

Bochkova M.S., Timganova V.P., Khramtsov P.V., Uzhviyuk S.V., Shardina K.Yu., Nechaev A.I., Raev M.B., Zamorina S.A.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. Graphene and its derivatives are increasingly used in biomedical research. Therefore, the mechanisms and consequences of the interaction of graphene nanoparticles with living objects are intensively studied. The immune system is involved in protecting the body and regulating its functions, so the question of the effect of graphene and its derivatives on immune cells is crucial. The specific response of monocytes, macrophages, and neutrophils to a stimulus is to increase the production of reactive oxygen species (ROS). Published data on graphene oxide (GO) and polyethylene glycol-modified graphene oxide (GO-PEG) effects on peripheral blood leukocytes are scarce and contradictory. It is due to variations in objects and conditions of study, along with the difference in particle concentrations. Thus, it was essential to evaluate the GO and GO-PEG effect on ROS production by human leukocytes.

Our study aimed at the effect of particles of unmodified and PEG-modified graphene oxide (GO and GO-PEG) on the ROS production by peripheral blood leukocytes in not-stimulated and stimulated luminol-dependent chemiluminescence (LCL) tests. ROS production was stimulated by opsonized zymosan (OZ). A hydrogen peroxide-luminol system was used for assessing the independent effect of GO nanoparticles on the quenching of ROS luminescence. Pristine GO (Ossila, Great Britain) nanoparticles were PEG-modified (GO-PEG). The average size of the GO flakes was 1-5 μm , the GO-PEG-flakes 569 ± 14 nm, and the amount of PEG covering was ~ 20%. Nanoparticles were used at concentrations of 5; 2.5; 1.25 $\mu\text{g/ml}$.

It has been established that GO-PEG nanoparticles in concentrations of 2.5 and 5 $\mu\text{g/ml}$ suppressed ROS production in the spontaneous LCL test. At the same time, the GO effects showed a visible but a not significant tendency to inhibition of LCL. Similar results were obtained in the stimulated LCL test. However, when analyzing the process kinetics, both GO-PEG and GO decreased the ROS production, but mainly in the first minutes of the test. When analyzing the quenching effect of the LCL reaction in a cell-free system, there was no significant effect of GO and GO-PEG nanoparticles.

Thus, the general vector of the obtained effects was associated with the suppression of ROS production. GO-PEG ROS-decreasing effects were more pronounced in comparison with unmodified GO. In general, we have confirmed the antioxidant effects of GO and GO-PEG using the LCL method. We can assume that in addition to the actual antioxidant effect of graphene nanoparticles, ROS production decreases due to the rapid GO uptake and blocking of several intracellular signals that induce an oxidative burst.

Keywords: graphene oxide, polyethylene glycol, luminol-dependent chemiluminescence, leukocytes, reactive oxygen species

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 19-15-00244.

Введение

Графен является двумерной аллотропной модификацией углерода, которая, в зависимости от размеров и структурных вариаций, может обладать разнообразным ценным для биомедицины свойствами: высокой удельной площадью поверхности, способностью к флуоресценции, антимикробной активностью, каталитической активностью. В связи с этим активно исследуется потенциал применения графена в иммунопрофилактике, адресной доставке лекарственных средств, биомаджинге, фототермальной терапии. Существенным препятствием на пути внедрения наноматериалов в клиническую практику являются весьма неполные знания об их безопасности для живых организмов. По этой причине в настоящее время усиленно изучаются механизмы и последствия взаимодействия наночастиц, в том числе и графена, с живыми объектами. Имунная система участвует в защите организма человека и регуляции его функций, поэтому вопрос о воздействии графена и его производных на иммунные клетки является принципиальным. Его решение важно и с точки зрения применения обнаруженных эффектов в иммунопрофилактике и терапии, например, при использовании графена как адьюванта. В этой работе мы исследовали влияние различных концентраций наночастиц оксида графена (ОГ) и наночастиц оксида графена, модифицированных полиэтиленгликолем (ОГ-ПЭГ) на продукцию активных форм кислорода лейкоцитами. Оксид графена был выбран нами, поскольку он сохраняет многие физико-химические свойства графена, но при этом более гидрофилен, а также содержит ряд функциональных групп, облегчающих его функционализацию.

Специфическим ответом моноцитов, макрофагов и нейтрофилов на стимул или раздражитель является увеличение продукции свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) – кислородный взрыв, который направлен на уничтожение чужеродных объектов. В ряде работ показано, что ОГ способствует инициации кислородного взрыва в нейтрофилах и макрофагах [14]. Предположительный механизм инициации выработки АФК описан на клеточной линии мышечных альвеолярных макрофагов (MHS). Он заключается в воздействии ОГ на окислительно-восстановительные реакции митохондриальной цепи переноса электронов, ускоряющем генерацию АФК как побочного продукта митохондриального дыхания. Однако продемонстрирован и противоположный, антиоксидантный эффект ОГ

на мышечные макрофаги, выделенные из костного мозга, выражающийся в сниженной выработке клетками АФК [4].

Поскольку литературные данные по влиянию ОГ и ОГ-ПЭГ на лейкоциты периферической крови немногочисленны и достаточно противоречивы ввиду использования разных концентраций частиц, разных условий и различных объектов исследования, в данной работе оценивали продукцию АФК периферическими лейкоцитами крови человека после кратковременного воздействия наночастиц.

Целью нашего исследования явилось изучение влияния наночастиц ОГ и модифицированного полиэтиленгликолем ОГ (ОГ-ПЭГ) на продукцию АФК лейкоцитами человека в тесте спонтанной и стимулированной зимозаном люминол-зависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ).

Материалы и методы

Исследование проводили в соответствии с Хельсинкской декларацией ВМА 2000 года и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 года, на работу с образцами периферической крови было получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН (IRB00010009) от 30.08.2019.

Модификация наночастиц оксида графена

В работе применялись частицы оксида графена, размер 1–5 мкм (Ossila Ltd, Великобритания). Монохлоруксусная кислота (99%), 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC, 98%), N-гидроксисукцинимид (NHS, > 98%), метоксиполиэтиленгликоль амин mPEG-NH₂ (MW 5 kDa) производства Alfa Aesar (США). Для синтезов применялась деионизованная вода (1-го класса), полученная с помощью системы очистки Merck Millipore Simplicity. Все реактивы использовались без дополнительной очистки.

Модификация ОГ ПЭГом (пегилирование) осуществляли методом ковалентной пришивки аминогрупп ПЭГ-NH₂ к поверхностным карбоксильным группами ОГ с образованием амидной связи. Для модификации готовили растворы ОГ концентрацией 2 мг/мл ультразвуковой обработкой мощностью 25 Вт в течение 30 мин. Карбоксилирование ОГ проводили в щелочной среде (NaOH) в присутствии Cl-CH₂-COOH при ультразвуковой обработке в течение 1 ч. Полученный раствор ОГ-COON нейтрализовали многократной промывкой деионизованной водой. Далее к суспензии ОГ-COON (pH 5,6) при ультразвуковой обработке в течение 5 мин добавляли NHS (10 ммоль/л), EDC (4 ммоль/л) и ПЭГ-NH₂ (2 мг/мл), для окончания реакции ковалентной пришивки ПЭГ раствор оставляли

при комнатной температуре на сутки. Полученную суспензию ОГ-ПЭГ очищали методом диализа и трехкратной промывкой с центрифугированием этиловым спиртом с финальной сушкой при 65 °С под вакуумом.

ИК-Фурье спектры исходного и модифицированных ОГ были получены на спектрометре IFS 66/S Bruker в области 400–4000 см⁻¹. Образцы для анализа готовили прессованием таблеток с KBr (2 мг образца к 299 мг KBr). Спектры поглощения растворов исходного и модифицированных ОГ были определены на двухлучевом спектрофотометре UV 2600 в диапазоне длин волн 200–900 нм. Распределение исходного и модифицированных ОГ по размеру, а также их дзета-потенциал в водных растворах определяли методом динамического светорассеяния на приборе ZetaPALS Brookhaven. Термогравиметрический анализ исходного и модифицированных ОГ был проведен на совмещенном ТГ-ДСК приборе NETZSCH STA 449 F1 при скорости нагревания 10 К/мин в диапазоне температур 30–700 °С.

Проведенные исследования пегелированных образцов ОГ показали, что процесс химической модификации прошел успешно, ароматическая структура ОГ не изменилась, а средний размер наночастиц пегелированного ОГ по сравнению с исходным, заявленным производителем 1–5 мкм, снизился до 569±14 нм, а количество покрывающего ОГ ПЭГа составляет порядка 19–20%.

Объекты исследования

В работе использовали лейкоциты крови условно здоровых доноров (n = 5, 35±7), которые выделяли спонтанной седиментацией в течение 40 минут при t = 37 °С. Эритроциты осаждали, а сыворотку с оставшимися в ней клетками отделяли. Далее клетки отмывали от сыворотки трехкратным центрифугированием при 350 g в течение 15 минут при помощи раствора Хэнкса без фенолового красного («Биолот», Россия) и доводили до концентрации 10⁶ клеток в мл. Все манипуляции проводили при 4 °С.

Постановка реакции ЛЗХЛ

Для оценки уровня ЛЗХЛ в лунки 96-луночного стерильного планшета для люминометра (Nunc, Дания) последовательно вносили раствор Хэнкса, ОГ и ОГ-ПЭГ в различных концентрациях (5 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 1,25 мкг/мл; 0 мкг/мл [15] (контроль — спонтанная ЛЗХЛ), 10 мкл суспензии клеток (10⁶/мл) и натриевую соль люминола (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 2 × 10⁻³ М. Индуктором кислородного взрыва выступал опсонизированный зимозан (ОЗ), поэтому в стимулированном варианте

ЛЗХЛ добавляли ОЗ до конечной концентрации 5 мкг/мл; 2,5 мкг/мл; 1,25 мкг/мл.

Кроме этого оценивали степень гашения ЛЗХЛ частицами ОГ и ОГ-ПЭГ (концентрации указаны выше) в бесклеточной системе. Эксперимент проводили таким же образом, как описано в предыдущем абзаце, за исключением того, что не добавляли зимозан и суспензию клеток, а люминесценцию индуцировали при помощи перекиси водорода. Концентрации перекиси водорода составляли 3%; 1,5%; 0,75%; 0,375%; 0,187%.

Интенсивность люминесценции измеряли в течение 60 минут с интервалом в 3 минуты на гибридном ридере “Synergy H1” (BioTek). Оценивали изменение люминесценции в динамике, а также рассчитывали интегральный показатель светосумму (S), то есть площадь под кривой хемилюминесценции, характеризующую суммарный синтез АФК за 60 мин исследования и равную сумме всех значений интенсивности люминесценции для каждой пробы.

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 6 с использованием теста Фридмана и post-hoc теста Данна для множественных сравнений. Данные представляли в виде медианы с межквартильным размахом — Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Различия считали достоверными при p < 0,05.

Результаты

Известно, что стимуляция лейкоцитов сопровождается генерацией активных форм кислорода (супероксид анион, перекись водорода, гидроксил радикал, активные формы хлора), обладающих мощным бактерицидным действием. Таким образом, ЛЗХЛ характеризует суммарную продукцию АФК лейкоцитами крови.

Влияние ОГ и ОГ-ПЭГ на интенсивность спонтанной ЛЗХЛ

Повышение концентрации ОГ и ОГ-ПЭГ от 1,25 до 5 мкг/мл приводило к уменьшению ЛЗХЛ, однако эти эффекты были статистически достоверными лишь для концентраций ОГ-ПЭГ равных 2,5 и 5 мкг/мл медианы светосумм были ниже медианы светосуммы пробы без наночастиц на 21, 39 и 45% соответственно. При исследовании аналогичных концентраций ОГ снижение медианного значения светосумм было менее существенным (на 9, 17 и 25%).

Влияние наночастиц ОГ и ОГ-ПЭГ на спонтанную и стимулированную ЛЗХЛ

Стоит отметить существенную вариабельность значений светосумм между образцами, получен-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОГ И ОГ-ПЭГ НА СПОНТАННУЮ И СТИМУЛИРОВАННУЮ ЛЗХЛ
TABLE 1. EFFECT OF GO AND GO-PEG NANOPARTICLES ON THE SPONTANEOUS AND STIMULATED LUMINOL-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE (LCL)

	ОЗ (мкг/мл) OZ (µg/ml)	ОГ-ПЭГ (мкг/мл) GO-PEG (µg/ml)				ОГ (мкг/мл) GO (µg/ml)			
		0	1,25	2,5	5	0	1,25	2,5	5
Светосумма Light sum Me (Q _{0.25} -Q _{0.75})	Спонтанный вариант ЛЗХЛ Spontaneous LCL option								
	0	33401 (27240-43355)	26427 (20407-34599)	20402 (15695-29110) p < 0,05*	18211 (15574-24117) p < 0,05*	43715 (30563-55617)	39603 (28814-51010)	36278 (27860-46441)	32889 (25083-42972)
	Сtimулированный вариант ЛЗХЛ Stimulated LCL option								
	1,25	35762 (25537-50842)	27241 (21875-36865)	20118 (17249-28516) p < 0,05*	18277 (16898-24519) p < 0,05*	50348 (38379-59529)	47151 (35959-55585)	43162 (32673-53438)	43901 (35654-50210)
	2,5	38366 (29432-51883)	32811 (29443-40998)	26469 (22934-32115) p < 0,05*	19955 (19343-25224) p < 0,05*	59020 (45397-68240)	52095 (37669-62478)	51218 (37523-61413)	47908 (36101-57789)
	5	45829 (40440-54533)	42900 (40902-49030)	38128 (35268-44080)	28278 (26660-33799)	75785 (58847-82171)	71565 (53195-80774)	64148 (49243-72062)	57067 (42777-67541)
Снижение медианы светосуммы образца по отношению к контролю Decrease of lighth sum medians of sample in relation to control	Спонтанный вариант ЛЗХЛ Spontaneous LCL option								
	0	–	21%	39%	45%	–	9%	17%	25%
	Сtimулированный вариант ЛЗХЛ Stimulated LCL option								
	1,25	–	24%	44%	49%	–	6%	14%	13%
	2,5	–	14%	31%	48%	–	12%	13%	19%
5	–	6%	17%	38%	–	6%	15%	25%	

Примечание. n = 5; p < 0,05 – достоверные по критерию Фридмана и критерию Данна для множественных сравнений различия по сравнению с соответствующей пробой без ОГ/ОГ-ПЭГ (первый столбец).

Note. n = 5; p < 0.05, significant differences according to the Friedman test and Dunn's test for multiple comparisons compared to the corresponding sample without GO/GO-PEG (first column).

ными от различных доноров, в том числе в экспериментах с зимозан-индуцированной ЛЗХЛ.

Таким образом, установлено, что наночастицы ОГ-ПЭГ в концентрациях 2,5 и 5 мкг/мл угнетали продукцию АФК в спонтанном варианте ЛЗХЛ, в то время как эффекты ОГ демонстриро-

вали видимую, но недостоверную тенденцию к угнетению ЛЗХЛ.

Влияние ОГ и ОГ-ПЭГ на интенсивность стимулированной зимозаном ЛЗХЛ

Мы использовали три различные концентрации зимозана для стимуляции ЛЗХЛ лейкоцита-

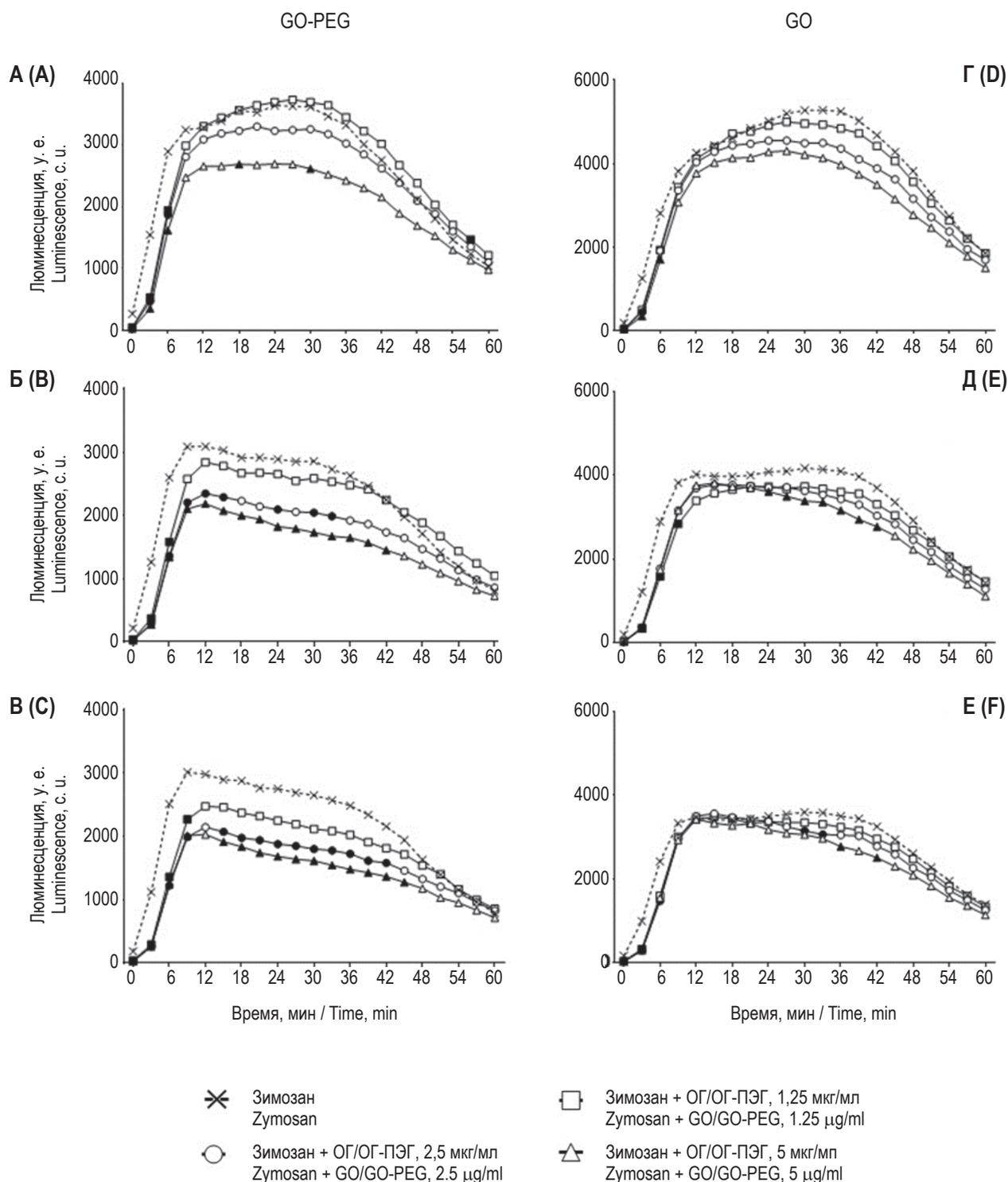


Рисунок 1. Влияние разных концентраций ОГ-ПЭГ и ОГ на кинетику ЛЗХЛ, стимулированной ОЗ, n = 5
Примечание. А, Б, В – пробы с ОГ-ПЭГ и 5, 2,5 и 1,25 мкг/мл зимозана соответственно. Г, Д, Е – пробы с ОГ и 5, 2,5 и 1,25 мкг/мл зимозана соответственно. Достоверные по критерию Фридмана и критерию Данна для множественных сравнений различия ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующей пробой без ОГ/ОГ-ПЭГ обозначены заштрихованным (черным) маркером.
Figure 1. Effect of GO-PEG and GO different concentrations on the kinetics of LCL stimulated by opsonized zymosan (OZ), n = 5
Note. A, B, C, samples with GO-PEG and 5, 2.5 and 1.25 µg/ml zymosan, respectively. D, E, F, samples with GO and 5, 2.5 and 1.25 µg/ml zymosan, respectively. Significant differences ($p < 0.05$), by the Friedman test and the Dunn test for multiple comparisons, compared with the corresponding sample without GO/GO-PEG are indicated by a shaded (black) marker.

ми. Наночастицы как ОГ, так и ОГ-ПЭГ снижали ЛЗХЛ, при этом лишь наночастицы ОГ-ПЭГ в концентрациях 2,5 и 5 мкг/мл статистически достоверно снижали ЛЗХЛ при стимуляции зимозаном в концентрациях 1,25 и 2,5 мкг/мл (табл. 1). Эффект подавления ЛЗХЛ был в большей степени выражен для наночастиц ОГ-ПЭГ, чем для наночастиц ОГ.

При анализе кинетики стимулированной ЛЗХЛ, было выявлено снижение люминесценции под влиянием ОГ и ОГ-ПЭГ во всех тестовых концентрациях начиная с самого начала реакции (рис. 1). При этом достоверные эффекты были отмечены преимущественно в начале реакции (0-9 минуты), однако заметна видимая тенденция к сохранению этого эффекта до выхода на плато (рис. 1).

Довольно интересно, что при использовании ОЗ в концентрации 5 мкг/мл снижение продукции АФК под воздействием наночастиц не фиксировались. По-видимому, подавляющий эффект наночастиц в данном случае компенсировался более интенсивной стимуляцией клетки со стороны ОЗ.

Таким образом, в стимулированном варианте ЛЗХЛ, наночастицы ОГ-ПЭГ (2,5 и 5 мкг/мл) подавляли продукцию АФК лейкоцитами, а наночастицы ОГ не оказывали достоверного эффекта. Однако при анализе процесса в кинетике продукцию АФК снижали как ОГ-ПЭГ, так и ОГ, преимущественно в первые минуты теста.

Влияние ОГ и ОГ-ПЭГ на ЛЗХЛ в бесклеточной модели с перекисью водорода

Поскольку ОГ и ОГ-ПЭГ снижали ЛЗХЛ лейкоцитов крови, мы предположили, что причиной этого может быть эффект тушения люминесценции частицами, не связанный с их воздействием на клетки. Поэтому мы смоделировали ЛЗХЛ, но без добавления лейкоцитов. В качестве индуктора люминесценции мы использовали перекись водорода. В результате проведенного исследования, эффекта тушения люминесценции наночастицами ОГ и ОГ-ПЭГ выявлено не было (данные не представлены).

Обсуждение

В ходе проведенных исследований мы установили, что присутствие наночастиц ОГ и ОГ-ПЭГ в среде с лейкоцитами приводит к снижению ЛЗХЛ с первых же минут после начала реакции, при этом эффект ОГ-ПЭГ был более выраженным. Была отмечена прямая зависимость между концентрацией наночастиц ОГ/ОГ-ПЭГ и уменьшением светосуммы.

Существуют различные возможные способы влияния наночастиц ОГ на ЛЗХЛ. Во-первых,

наночастицы ОГ могут непосредственно взаимодействовать с АФК и люминолом, изменяя интенсивность ЛЗХЛ, во-вторых, ОГ может оказывать влияние на продукцию АФК лейкоцитами.

Статическое и динамическое тушение флуоресценции ряда органических флуорофоров ОГ было продемонстрировано Povedailo и соавт. [10]. Более того, тушение люминесценции люминола было показано как для смеси люминола и ОГ [3], так и для комплексов ОГ с адсорбированным люминолом [6]. Однако мы установили, что ОГ не подавлял люминесценцию люминола, инициированную H_2O_2 в бесклеточной системе. Известно, что ЛЗХЛ отражает суммарную (внутриклеточную и внеклеточную) продукцию АФК, прежде всего супероксид-аниона, а кроме того перекиси водорода. Для инициации ЛЗХЛ при помощи H_2O_2 требуются либо ее высокие концентрации (как в указанном контрольном эксперименте), либо присутствие пероксидаз, в частности миелопероксидазы нейтрофилов [2].

Данные об антиоксидантной активности ОГ в отношении различных форм АФК достаточно противоречивы. Согласно одним исследованиям он проявляет очень низкую антиоксидантную активность по отношению к H_2O_2 и OH^* в концентрациях, которые были использованы в нашей работе [1, 7], в то же время в статье Qui et al. [11] говорится о высокой антиоксидантной активности ОГ в концентрации 10 мкг/мл и менее в отношении OH^* , а также о его способности нейтрализовать супероксид-анион (в концентрации около 80 мкг/мл). Химическая модификация ОГ (допирование азотом, введение различных функциональных групп) существенно увеличивает его антиоксидантную активность [13], в связи с этим можно предположить, что пегилирование оказывает влияние на нейтрализацию АФК ОГ, однако Nilewski и соавт. [9] показали, что пегилирование не оказывает существенного эффекта на антиоксидантную активность ОГ в отношении супероксид-аниона.

Таким образом, взаимодействие ОГ с АФК является одной из возможных причин снижения интенсивности люминесценции. Различия между пегилированным и не пегилированным ОГ заключаются, по всей видимости, в большей удельной площади поверхности ОГ-ПЭГ в сравнении с ОГ ввиду их меньшего размера. Кроме того, наночастицы ОГ-ПЭГ ввиду поверхностной модификации в меньшей степени агрегировали в культуральной среде, что также увеличивало их удельную площадь поверхности относительно ОГ.

Еще одно объяснение подавления ЛЗХЛ под воздействием ОГ заключается в его влиянии на

продукцию АФК лейкоцитами. Показано, что зимозан быстро (минута или даже меньше) активизирует Dectin-1-ассоциированные кальций-зависимые сигнальные пути, что сопровождается фосфорилированием ряда сигнальных молекул [5], в частности кальмодулин-зависимой киназы и других. Ранее было показано, что ОГ обладает способностью снижать уровень фосфорилирования некоторых переносчиков внутриклеточных сигналов, в частности протеинкиназы В и ингибировать экспрессию индуцибельной NO-синтазы макрофагов [4], а значит, снижение продукции АФК посредством быстрого блокирования внутриклеточных сигналов ОГ является вероятным сценарием. Тем не менее в большинстве исследований показано усиление продукции АФК клетками под воздействием ОГ, что, в частности, является основой концепции его использования в фотодинамической терапии [14]. В наших экспериментах эффект ОГ на продукцию АФК проявлялся уже в первые минуты после его добавления к суспензии лейкоцитов. Достаточно сложно сказать, могли ли частицы ОГ и ОГ-ПЭГ оказать воздействие на лейкоциты за столь ко-

роткое время. Согласно имеющимся данным интернализация частиц оксида графена протекает весьма быстро: частицы ОГ размером 453 нм уже через 2 минуты после начала инкубации обнаруживались внутри макрофагов (в отличие от более мелких частиц) [8]. Это говорит о возможности того, что эффекты ОГ могут проявляться почти мгновенно. С другой стороны, в исследованиях, в которых было показано снижение продукции АФК клетками, использовалась длительная предварительная инкубация исследуемых клеток с оксидом графена [4, 12]. Стоит отметить, что размер наночастиц ОГ, а также характер их модификации может оказывать влияние на механизмы взаимодействия клеток и графена.

Таким образом, нами были подтверждены антиоксидантные эффекты ОГ и ОГ-ПЭГ при помощи метода ЛЗХЛ. Механизмы, лежащие в основе этих эффектов, мы планируем установить в дальнейшем. Антиоксидантные свойства графена могут быть использованы в терапевтических целях, однако для этого еще предстоит найти способы регулировать баланс между его про- и антиоксидантной активностью.

Список литературы / References

1. Baali N., Khecha A., Bensouici A., Speranza G., Hamdouni N. Assessment of antioxidant activity of pure graphene oxide (GO) and ZnO-decorated reduced graphene oxide (rGO) using dpqh radical and H₂O₂ scavenging assays. *J. Carbon Res.*, 2019, Vol. 5, no. 4, 75. doi: 10.3390/c5040075.
2. Bedouhène S., Mouliti-Mati F., Hurtado-Nedelec M., Dang P.M., El-Benna J. Luminol-amplified chemiluminescence detects mainly superoxide anion produced by human neutrophils. *Am. J. Blood Res.*, 2017, Vol. 7, no. 4, pp. 41-48.
3. Bi S., Zhao T., Luo B. A graphene oxide platform for the assay of biomolecules based on chemiluminescence resonance energy transfer. *Chem. Commun.*, 2012, Vol. 48, Iss. 1, pp. 106-108.
4. Han J., Kim Y.S., Lim M.Y., Kim H.Y., Kong S., Kang M., Choo Y.W., Jun J.H., Ryu S., Jeong H.Y., Park J., Jeong G.J., Lee J.C., Eom G.H., Ahn Y., Kim B.S. Dual roles of graphene oxide to attenuate inflammation and elicit timely polarization of macrophage phenotypes for cardiac repair. *ACS Nano*, 2018, Vol. 12, pp. 1959-1977.
5. Kelly E.K., Wang L., Ivashkiv L.B. Calcium-activated pathways and oxidative burst mediate zymosan-induced signaling and IL-10 production in human macrophages. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, Iss. 10, pp. 5545-5552.
6. Lee M.Y., Kim S.Y., Kim H.G., In I. Chemiluminescence quenching of luminol-functionalized chemically reduced graphene oxide through noncovalent interaction. *Chem. Lett.*, 2013, Vol. 42, no. 1, pp. 48-49.
7. Marković Z.M., Jovanović S.P., Mašković P.Z., Mojsin M.M., Stevanović M.J., Danko M., Mičušík M., Jovanović D.J., Kleinová A., Špitalský Z., Pavlović V.B., Todorović Marković B.M. Graphene oxide size and structure pro-oxidant and antioxidant activity and photoinduced cytotoxicity relation on three cancer cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2019, Vol. 200, 111647. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2019.111647.
8. Mendes R.G., Mandarino A., Koch B., Meyer A.K., Bachmatiuk A., Hirsch C., Gemming T., Schmidt O.G., Liu Z., Rummeli M.H. Size and time dependent internalization of label-free nano-graphene oxide in human macrophages. *Nano Res.*, 2017, Vol. 10, pp. 1980-1995.
9. Nilewski L., Mendoza K., Jalilov A.S., Berka V., Wu G., Sikkema W.K.A., Metzger A., Ye R., Zhang R., Luong D.X., Wang T., McHugh E., Derry P.J., Samuel E.L., Kent T.A., Tsai A.L., Tour J.M. Highly oxidized graphene quantum dots from coal as efficient antioxidants. *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2019, Vol. 11, Iss. 18, pp. 16815-16821.
10. Povedailo V.A., Ronishenko B.V., Stepuro V.I., Tsybulsky D.A., Shmanai V.V., Yakovlev D.L. Fluorescence quenching of dyes by graphene oxide. *J. Appl. Spectro.*, 2018, Vol. 85, pp. 605-610.
11. Qiu Y., Wang Z., Owens A.C., Kulaots I., Chen Y., Kane A.B., Hurt R.H. Antioxidant chemistry of graphene-based materials and its role in oxidation protection technology. *Nanoscale*, 2014, Vol. 6, Iss. 20, pp. 11744-11755.

12. Ren C., Hu X., Zhou Q. Graphene oxide quantum dots reduce oxidative stress and inhibit neurotoxicity *in vitro* and *in vivo* through catalase-like activity and metabolic regulation. *Adv. Sci.*, 2018, Vol. 5, Iss. 5, 1700595. doi: 10.1002/advs.201700595.
13. Ruiz V., Yate L., García I., Cabanero G., Grande H.J. Tuning the antioxidant activity of graphene quantum dots: protective nanomaterials against dye decoloration. *Carbon*, 2017, Vol. 116, pp. 366-374.
14. Tabish T.A., Zhang S., Winyard P.G. Developing the next generation of graphene-based platforms for cancer therapeutics: The potential role of reactive oxygen species. *Redox Biol.*, 2018, Vol. 15, pp. 34-40.
15. Xu M., Zhu J., Wang F., Xiong Y., Wu Y., Wang Q., Weng J., Zhang Z., Chen W., Liu S. Improved *in vitro* and *in vivo* biocompatibility of graphene oxide through surface modification: poly (acrylic acid)-functionalization is superior to PEGylation. *ACS Nano*, 2016, Vol. 10, Iss. 3, pp. 3267-3281.

Авторы:

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Тимганова В.П. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Храпцов П.В. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Ужвийук С.В. — инженер лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Шардина К.Ю. — инженер лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Authors:

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Timganova V.P., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Khrantsov P.V., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Uzhviyuk S.V., Engineer, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Shardina K.Yu., Engineer, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Нечаев А.И. — инженер лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Раев М.Б. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Заморина С.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, г. Пермь, Россия

Nechaev A.I., Engineer, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Raev M.B., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Zamorina S.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 08.05.2020
Принята к печати 11.05.2020

Received 08.05.2020
Accepted 11.05.2020