# ВЛИЯНИЕ ПЕГИЛИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ФАГОЦИТАРНУЮ И ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА

Бочкова М.С., Ракутина М.Н., Усанина Д.И., Тимганова В.П., 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.** Научно-технический прогресс способствует открытию и производству инновационных материалов. Появление графена — яркий тому пример. Графен считается перспективным материалом для применения в нанобиомедицине и в нанобиотехнологиях, поэтому важно понимать, как он влияет на иммунные клетки человека.

Целью исследования было изучение эффектов 5 и 25 мкг/мл наночастиц оксида графена с латеральными размерами 100-200 нм и 1-5 мкм, модифицированных линейным и разветвленным полиэтиленгликолем, на функциональную активность нейтрофилов человека.

Образование активных форм кислорода исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа с использованием в качестве активатора хемилюминесценции люцигенина в микроварианте (96-луночный планшет) в течение 60 минут. Кроме того, исследовали эффект 60-минутной инкубации нейтрофилов с наночастицами пегилированного оксида графена на жизнеспособность этих клеток с окрашиванием их трипановым синим и 30-минутной инкубации — на поглощение нейтрофилами меченых флуоресцеином изоцианатом *E. coli* K-12 (лабораторный штамм). Пробы анализировали на проточном цитометре CytoFlex S. Определяли процент меченых флуоресцеином изоцианатом (поглотивших *E. coli*) нейтрофилов и индекс поглощения (медиана флуоресценции в гейте меченых флуоресцеином изотиоцианатом клеток, деленная на количество клеток в этом гейте). Образцы без добавления наночастиц служили контролем.

Было обнаружено снижение показателей люцигенин-усиленной хемилюминесценции нейтрофилов под влиянием двух типов наночастиц оксида графена: размером 1-5 мкм, покрытых линейным полиэтиленгликолем, и размером 100-200 нм, покрытых разветвленным полиэтиленгликолем, в концентрации 25 мкг/мл в стимулированном зимозаном варианте теста. Зависимости эффекта от разме-

#### 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

#### Образец цитирования:

М.С. Бочкова, М.Н. Ракутина, Д.И. Усанина, В.П. Тимганова, С.А. Заморина «Влияние пегилированных наночастиц оксида графена на фагоцитарную и окислительную активность нейтрофилов человека» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26, № 5. С. 1071-1078. doi: 10.15789/1563-0625-10P-16732

© Бочкова М.С. и соавт., 2024 Эта статья распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0

#### Address for correspondence:

Mariya S. Bochkova Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms 13 Golev St Perm 614081 Russian Federation Phone: +7 (342) 280-77-94. Fax: +7 (342) 280-92-11. E-mail: krasnykh-m@mail.ru

#### For citation:

M.S. Bochkova, M.N. Rakutina, D.I. Usanina, V.P. Timganova, S.A. Zamorina "Influence of pegylated graphene oxide nanoparticles on the respiratory burst and phagocytic activity of human neutrophils", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 5, pp. 1071-1078. doi: 10.15789/1563-0625-IOP-16732

© Bochkova M.S. et al., 2024 The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License **DOI:** 10.15789/1563-0625-IOP-16732 ра частиц и типа полиэтиленгликоля не обнаружено. Показатели спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов при добавлении наночастиц пегилированного оксида графена не изменялись.

Тридцатиминутная инкубация нейтрофилов человека при 37 °C с наночастицами пегилированного оксида графена с латеральными размерами 100-200 нм и 1-5 мкм не оказывала влияния на жизнеспособность этих клеток, а также на процент нейтрофилов, поглотивших *E. coli*. Однако модифицированный линейным полиэтиленгликолем оксид графена размером 1-5 мкм в концентрации 25 мкг/мл увеличивал количество поглощенных нейтрофилами *E. coli* из расчета на одну клетку.

Таким образом, при отсутствии цитотоксичности, частицы пегилированного оксида графена обладают разнонаправленными иммуномодулирующими эффектами на нейтрофилы. При этом важна именно их концентрация, а не размер частиц оксида графена и тип полиэтиленгликоля.

Ключевые слова: оксид графена, полиэтиленгликоль, люцигенин-зависимая хемилюминесценция, нейтрофилы, активные формы кислорода, фагоцитоз

# INFLUENCE OF PEGYLATED GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON THE RESPIRATORY BURST AND PHAGOCYTIC ACTIVITY OF HUMAN NEUTROPHILS

Bochkova M.S., Rakutina M.N., Usanina D.I., Timganova V.P., Zamorina S.A.

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

**Abstract.** Scientific and technological progress contributes to the discovery and production of innovative materials. The emergence of graphene is a clear example of this. Graphene is considered a promising material for use in nanobiomedicine and nanobiotechnology. It is therefore important to understand how it affects human immune cells. In a study, the effects of 5 and 25  $\mu$ g/mL graphene oxide nanoparticles with lateral sizes of 100-200 nm and 1-5  $\mu$ m, modified with linear and branched polyethylene glycol, on human neutrophils were investigated. The formation of reactive oxygen species was evaluated with a lucigenin as a chemiluminescence activator. In addition, we investigated the effect of a 60-minute incubation of neutrophils with pegylated graphene oxide nanoparticles on the viability of these cells by staining with trypan blue and a 30-minute incubation on the uptake of fluorescein isocyanate-labelled *E. coli*. The percentage of neutrophils which engulfed *E. coli* and the uptake index were determined. Samples without added nanoparticles served as controls.

A decrease in lucigenin-enhanced chemiluminescence of neutrophils was observed under the influence of two types of graphene oxide nanoparticles: 1-5  $\mu$ m in size coated with linear polyethylene glycol, and 100-200 nm in size coated with branched polyethylene glycol, at a concentration of 25  $\mu$ g/mL in the zymosan-stimulated version of the assay. No dependence of the effect on the particle size and the type of polyethylene glycol was observed. The indicators for spontaneous chemiluminescence of neutrophils did not change with the addition of PEGylated graphene oxide nanoparticles.

A thirty-minute incubation of human neutrophils at 37 °C with PEGylated graphene oxide nanoparticles with lateral dimensions of 100-200 nm and 1-5  $\mu$ m had no effect on the viability of these cells and on the percentage of neutrophils that engulfed *E. coli*. However, 1-5  $\mu$ m graphene oxide modified with linear polyethylene glycol at a concentration of 25  $\mu$ g/mL increased the amount of *E. coli* engulfed by neutrophils per cell.

Thus, in the absence of cytotoxicity, PEGylated graphene oxide particles have multidirectional immunomodulatory effects on neutrophils. In this case, their concentration is decisive and not the size of the graphene oxide particles and the type of polyethylene glycol.

Keywords: graphene oxide, polyethyleneglycol, lucigenin-dependent chemiluminescence, neutrophils, reactive oxygen species, phagocytosis

Работа выполнена в рамках государственного задания №124021900006-5 с использованием оборудования ЦКП «Исследования материалов и вещества» ПФИЦ УрО РАН.

## Введение

Графен — это двумерная структурная форма углерода, состоящая из одного атомного слоя. Благодаря своим структурным особенностям графен и его производные обладают рядом уникальных физических свойств, таких как высокая тепло- и электропроводность, механическая прочность и гибкость, способность к флуоресценции, и поэтому крайне перспективны для применения в биомедицинских исследованиях, например, в качестве наноносителя, компонента биосенсоров или подложки для тканевой инженерии [12].

В данной работе был использован оксид графена (GO), так как для него характерны: гидрофильность, высокая реакционная способность, возможность получения материала с заданным химическим составом [3]. Покрытие GO влияет на его поглощение клетками [6]. Модификация различными полимерами, в частности, полиэтиленгликолем (ПЭГ) позволяет существенно улучшить не только стабильность, но и биосовместимость GO [7]. Для функционализации наночастиц используют разные виды ПЭГ. Ранее Хи и коллеги [15] показали, что покрытие GO разветвленным ПЭГ обеспечивает лучшую коллоидную стабильность наночастиц по сравнению с линейным ПЭГ. Кроме того, «многорукие» молекулы на поверхности частицы увеличивают потенциал ее последующей функционализации. Размер наночастиц также является одним из факторов, критичным для их биосовместимости и определяющим, какие именно функции клетки они могут модулировать.

Нейтрофилы составляют примерно 50-70% от лейкоцитов крови человека и играют важную роль в защите хозяина от патогенов. При проникновении чужеродного объекта нейтрофилы немедленно мигрируют в участки инфекции.

Одним из основных способов уничтожения патогенов нейтрофилами является продукция активных форм кислорода (АФК), или их окислительная активность.

Ранее нами было изучено влияние GO и покрытого ПЭГ GO на люминол-зависимую хемилюминесценцию общей фракции лейкоцитов крови [1]. Люминол-зависимая хемилюминесценция отображает синтез всех АФК клетки, тогда как при помощи люцигенина можно детектировать, главным образом, супероксид-радикал, образование которого катализируется мембранной НАДФН-оксидазой (NOX) [14]. Поскольку супероксид-радикал является «пусковым» анионом для синтеза вторичных АФК, а взаимодействие клеток с частицами определяется непосредственно мембраной, на которой и происходит сборка ферментативного комплекса NOX, представляется важным оценить именно люцигинин-зависимую хемилюминесценцию.

Известно, что нейтрофилы способны быстро поглощать частицы небиологической природы нано- и микрометрового размера, причем интенсивность поглощения зависит, в частности, от типа модификации поверхности частиц и от их размера [4]. Поэтому важно понимать, каким образом поглощение наночастиц GO разного размера и с разным типом поверхностной модификации может влиять на фагоцитоз биологических объектов.

Таким образом, **целью** данной работы стало определение влияния наночастиц GO с разными латеральными размерами и покрытых линейным и разветвленным ПЭГ на окислительную и фагоцитарную активность нейтрофилов человека.

## Материалы и методы

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

В работе использовали гепаринизированную кровь условно здоровых доноров (n = 5, возраст 24±7 лет). Нейтрофилы выделяли центрифугированием в двойном градиенте плотности препаратов Histopaque<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich, CША):  $\rho =$ 1,077 г/см<sup>3</sup> и  $\rho = 1,119$  г/см<sup>3</sup>. Для этого разведенную раствором Хенкса в 2 раза кровь наслаивали на двойной градиент плотности Histopaque® и центрифугировали 40 минут при 400 g, 20 °C. Далее полученную суспензию нейтрофильных гранулоцитов дважды отмывали в растворе Хенкса (Биолот, Россия) по 15 минут при 350 g, 4°C. Супернатант сливали, затем нейтрофилы разводили в 1 мл раствора Хенкса, после этого подсчитывали количество клеток в камере Нейбауэра. Клетки использовали в концентрации 1 × 10<sup>6</sup> кл./мл.

В нашей работе мы использовали наночастицы GO двух латеральных размеров: 100-200 нм – GOs и 1-5 мкм – GOb (Ossila Ltd., Великобритания), покрытых линейным (Р-) и восьмилучевым разветвленным (bP-) ПЭГ для того, чтобы сопоставить эффекты размера наночастиц и типа функционализации. Методика модификации наночастиц GO описана нами ранее в статье [11]. Частицы приобретены, модифицированы и охарактеризованы в рамках выполнения проекта РНФ № 19-15-00244.

Нейтрофилы инкубировали с bP/P-GO до достижения конечных концентраций наночастиц 5 и 25 мкг/мл в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), не содержащей фенолового красного, с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки в течение 60 минут в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>; +37 °C). По истечении 60 минут клетки окрашивали 1:1 с 0,4% трипановым синим и оценивали процент окрашенных (мертвых) клеток в камере Нейбауэра с помощью светового микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия).

Окислительную активность нейтрофилов человека, а именно образование супероксидрадикала (О<sup>2-</sup>) и активность NOX, определяли при помощи 96-луночного микроварианта теста хемилюминесценции люцигенин-усиленной (ЛюцХЛ). Стимуляцию окислительной активности нейтрофилов осуществляли опсонизированным зимозаном (O3) (Sigma-Aldrich, CША), добавляя его к клеткам до конечной концентрации 1,5 мкг/мл. Люцигенин (синтезирован и любезно предоставлен д-ром Денисом Ларкиным, Москва, Россия) использовали в концентрации 5 мкМ. Также оценивали ЛюцХЛ в нестимулированном варианте теста, без добавления ОЗ к нейтрофилам.

Для оценки уровня ЛюцХЛ в лунки 96-луночного стерильного планшета для люминометра (Nunc, Дания) последовательно вносили раствор Хенкса, наночастицы GO, (контроль - спонтанная ЛюцХЛ), 10% пулированной инактивированной человеческой сыворотки, люцигенин, ОЗ и клеточную суспензию (106 кл/мл). Интенсивность люминесценции измеряли в течение 60 минут с интервалом в 3 минуты на гибридном ридере "Synergy H1" (Bio Tek Instruments, США) при 37 °С. Оценивали изменение люминесценции в динамике, а также рассчитывали интегральный показатель: светосумму (S), характеризующую суммарный синтез АФК за 60 мин исследования и равную сумме всех значений интенсивности люминесценции для каждой пробы.

Эффект наночастиц P-GO на фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали при помощи проточной цитометрии. Объекты фагоцитоза готовили следующим образом: суспензию бактерий (лабораторный штамм *E. coli* K-12, любезно предоставлен к.б.н. И.Л. Масленниковой, «ИЭГМ УрО РАН», Пермь) с концентрацией 1 × 10<sup>8</sup> клеток/мл осаждали центрифугированием 10 000g 10 минут при 4 °C. Снимали супернатант, к осадку добавляли 2 мл 70% этилового спирта и ресуспендировали. Бактерии инкубировали при комнатной температуре 45 минут на ротаторе. После инактивации клетки отмывали центрифугирова-

нием 10 000 g 10 минут при 4 °С, раствором Дульбекко (ПанЭко, Россия). После чего к осадку добавляли 0,1 М карбонат-бикарбонатного буфера с добавлением флуоресцеина изоцианата (FITC, Sigma Aldrich, США) из расчета 50 мкг FITC на 100 000 клеток и инкубировали 60 минут в темноте на ротаторе при 37 °С. После этого проводили 4-кратную отмывку клеток от FITC центрифугированием в растворе Дульбекко (DPBS, Gibco, США) (10 минут, 4 °С, 10 000 g), хранили концентрированную суспензию FITC-*E. coli* в этом же растворе.

Выделенные нейтрофилы (2 × 10<sup>6</sup> клеток/мл) в среде RPMI-1640 (Sigma Aldrich, США), не содержащей фенолового красного, с добавлением 10% эбриональной телячьей сыворотки смешивали в полипропиленовых пробирках с наночастицами P-GO до достижения конечных концентраций наночастиц 5 и 25 мкг/мл и инкубировали в течение 30 минут в термостате (+37 °C).

После 30-минутной инкубации нейтрофилов с P-GO в пробы добавляли FITC-E. coli (2 × 107 клеток/мл) и инкубировали еще 30 минут при +37 °С. После этого все пробы одновременно погружали в лед на 10 минут для остановки фагоцитоза, однократно промывали 2 мл холодного фосфатно-солевого буфера без кальция и магния (DPBS, Gibco, США) с 0,5% БСА и 0,1% азида натрия при помощи центрифугирования 10 минут при 350 g и 4 °С. Затем пробы анализировали на проточном цитометре CytoFlex S (Beckman Coulter, США). Данные обрабатывали в программе CytExpert (Beckman Coulter, CША). В каждом образце определяли процент FITCпозитивных (поглотивших FITC-E. coli) клеток в гейте нейтрофилов, предварительно выделенном на диаграмме светорассеяния (FSC/SSC). Индекс фагоцитоза определяли путем деления значения медианы флуоресценции гейта FITC+ клеток (линейный гейт, расположенный справа от пика аутофлуоресценции клеток в образце без E. coli), на количество клеток клеток в нем (рис. 1). Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8 с использованием критерия Фридмана и критерия Данна для множественных сравнений. Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей – Ме (Q<sub>0.25</sub>-Q<sub>0.75</sub>). Различия считали значимыми при p < 0,05.

## Результаты и обсуждение

Влияние наночастиц GO на жизнеспособность нейтрофилов оценивали через 60 минут совместного культивирования. Наночастицы не оказывали статистически значимого влияния на жизнеспособность нейтрофилов (табл. 1). Таким образом, кратковременное воздействие наночастиц оксида графена, покрытых ПЭГ, в исследуемых концентрациях не оказывает токсического действия на нейтрофилы.

В научной литературе есть много данных, говорящих о наличии токсичности GO и редуцированного GO в отношении разных типов клеток [8]. Поскольку нейтрофилы являются короткоживущими фагоцитами, преобладающими в кровотоке, а способность этих клеток быстро нейтрализовать патогены и поглощать наночастицы разного происхождения может в ряде случаев сопровождаться их гибелью, например, с образованием внеклеточных нейтрофильных ловушек [10], при оценке безопасности наноматериалов в первую очередь необходимо уделять внимание этим клеткам. В случае с исследованными нами частицами пегилирование GO, как и в упомянутой нами ранее литературе, вероятно, привело к улучшению биосовместимости этого материала [7].

При исследовании влияния наночастиц GO разных размеров, покрытых разными типами полиэтиленгликоля, на поглощение бактерий, не было обнаружено статистически значимого

изменения процента фагоцитирующих клеток. Однако был выявлен стимулирующий эффект 25 мкг/мл P-GOb на индекс фагоцитоза, то есть на количество бактерий *E. coli*, поглощенных одним нейтрофилом (табл. 1).

К. Ваbin и соавт. было показано, что наночастицы оксидов металлов (титана, цинка, церия) преимущественно в концентрациях 50, 100 и 150 мкг/мл усиливают фагоцитоз нейтрофилов за счет активации тирозинкиназы syk, что приводило к запуску фосфатидилинозитол- 3-киназы, протеинкиназы С и других ферментов необходимых для полимеризации актина и ремоделированию мембраны, которые являются ключевыми факторами для поглощения частиц [2]. Возможно, и в нашем случае подобные механизмы лежат в основе повышения поглотительной активности нейтрофилов.

При исследовании влияния наночастиц P-GO на интенсивность спонтанной ЛюцХЛ, не было выявлено никаких эффектов (рис. 2А). Однако в стимулированном ОЗ варианте теста было отмечено снижение значений ЛюцХЛ на протяжении всей реакции (60 мин., данные не представлены) под влиянием наночастиц P-GOb, в концентра-

# ТАБЛИЦА 1. ЭФФЕКТ НАНОЧАСТИЦ ПЕГИЛИРОВАННОГО GO НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ И ПОКАЗАТЕЛИ НЕЙТРОФИЛЬНОГО ФАГОЦИТОЗА, n = 5; Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>)

TABLE 1. EFFECT OF PEGYLATED GO NANOPARTICLES ON NEUTROPHIL VIABILITY AND INDICATORS OF NEUTROPHIL PHAGOCYTOSIS, n = 5; Me  $(Q_{0.25}-Q_{0.75})$ 

	<b>Контроль</b> Control	P-GOs	bP-GOs	P-GOb	bP-GOb
		<b>5 мкг/мл</b> 5 μg/mL			
<b>% живых нейтрофилов</b>	99	98,5	99	99	99,5
% of viable neutrophils	(98,25-99,75)	(98-99)	(97,5-99,75)	(97,25-100)	(98,25-100)
<b>% фагоцитоза</b>	58,37	62,02	60,74	63,77	62,53
% of phagocytosis	(57,46-61,57)	(57,15-62,27)	(56,90-62,53)	(56,32-65,69)	(58,22-66,17)
Индекс фагоцитоза	75,75	63,06	58,47	76,77	74,26
Index of phagocytosis	(45,98-87,69)	(38,97-80,98)	(31,56-80,38)	(50,93-101,6)	(51,17-88,42)
	<b>Контроль</b> Control	<b>25 мкг/мл</b> 25 μg/mL			
<b>% живых нейтрофилов</b>	99	97,5	97,5	99,5	99
% of viable neutrophils	(98,25-99,75)	(92,5-98)	(96,25-98,75)	(98,25-100)	(98,25-99,75)
<b>% фагоцитоза</b>	58,37	57,65	59,87	59,75	61,93
% of phagocytosis	(57,46- 61,57)	(56,59-60,13)	(56,25-62,54)	(55,57-61,19)	(58,34-71,92)
Индекс фагоцитоза Index of phagocytosis	75,75 (45,98-87,69)	85,33 (48,75-97,72)	73,40 (49,68-89,34)	86,21 (57,39-95,66) p = 0,0311	60,49 (34,02-102,0)

Примечание. Значение р указано только для р < 0,05.

Note. p value is only reported for p < 0.05.



Рисунок 1. Гейтирование нейтрофилов, поглотивших FITC – E. coli

Примечание. А – контроль без FITC – E. coli и наночастиц GO. Б – проба с 25 мкг/мл P-GOs и FITC – *E. coli*. Над линейным гейтом приведены количество FITC<sup>+</sup> событий (Events), процент фагоцитирующих FITC<sup>+</sup> нейтрофилов (% Parent) и медиана флуоресценции гейта FITC<sup>+</sup> нейтрофилов (Median FITC-A).

Figure 1. Gating of neutrophils that have engulfed FITC - E. coli

Note. A, control without FITC – *E. coli* and GO nanoparticles. B, sample with 25  $\mu$ g/mL P-GOs and FITC – *E. coli*. The number of FITC+ events, the percentage of phagocytising FITC<sup>+</sup> neutrophils (% Parent) and the median fluorescence of the FITC<sup>+</sup> neutrophil gate (Median FITC-A) are shown above the linear gate.



Рисунок 2. Влияние наночастиц P-GO/bP-GO с разными латеральными размерами на люцигенин-зависимую хемилюминесценцию в спонтанном (А) и стимулированном (Б) вариантах теста (n = 5, Me (Q<sub>0,25</sub>-Q<sub>0,75</sub>), min и max) Примечание. По оси x – разные концентрации наночастиц, по оси y – значение светосуммы в относительных световых единицах. К- – контроль без GO.

Figure 2. Effect of P-GO/bP-GO nanoparticles with different lateral sizes on lucigenin-dependent chemiluminescence in spontaneous (A) and stimulated (B) versions of the assay (n = 5, Me ( $Q_{0.25}$ - $Q_{0.75}$ ), min  $\mu$  max)

Note: Along the x-axis, different concentrations of nanoparticles; along the y-axis, the value of the light sum in relative light units. K-, control without GO.

ции 25 мкг/мл, выразившееся и в снижении интегрального показателя ЛюцХЛ светосуммы. Как мы видим на графике, этот эффект был статистически значимым не только по отношению к контролю, но и по отношению к низкой концентрации этих же частиц (рис. 2Б). Интересно, что аналогичные результаты выявлены и с «мелкими» наночастицами, покрытыми другим типом ПЭГ (bP-GOs) в той же концентрации (рис. 2Б). Статистически значимое снижение продукции супероксид-радикала наблюдалось и в пробах с двумя оставшимися типами частиц в концентрации 25 мкг/мл, но только в отдельные временные точки снятия результатов (данные не представлены), что не выразилось в достоверном снижении значения светосуммы, однако и в этих пробах наблюдалась тенденция к снижению данного показателя (рис. 2Б).

Таким образом, нами не выявлено зависимости эффекта угнетения синтеза супероксид-радикала наночастиц от их размера и типа пришитого ПЭГ, но ясно видна его корреляция с концентрацией GO.

Углеродные наноматериалы обладают антиоксидантной активностью и могут использоваться в защите клеток, подвергшихся сильному окислительному стрессу. Оксид графена не является исключением. Например, в статье Qui et al. [13], приведены данные о высокой антиоксидантной активности GO в концентрации 10 мкг/мл и менее в отношении гидроксид-радикала, а также о его способности нейтрализовать супероксиданион (в концентрации около 80 мкг/мл). Помимо этого, есть сведения, что антиоксидантная способность GO может быть усилена химическим восстановлением [5]. Кроме того, и покрывающий наночастицы полиэтиленгликоль может дополнять описанные свойства GO. В статье Karla Juarez-Moreno показано, что ПЭГ способен снижать продукцию гидроксильных радикалов [9].

В наших предыдущих исследованиях мы показали аналогичное снижение люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов под действием высоких концентраций немодифицированных и модифицированных линейным ПЭГ наночастиц GO размером 1-5 мкм [1]. Вновь полученные результаты подтвердили антиоксидантную активность P-GO и в отношении супероксидрадикала. Вероятно, антиоксидантные свойства P-GO могут найти применение в биомедицине, но нужно понимать, что в случае с нейтрофилами угнетение АФК-опосредованной бактерицидности может привести к негативным последствиям.

### Заключение

Таким образом, наночастицы пегилированного оксида графена разных латеральных размеров, не оказывая токсического действия на нейтрофилы, способны разнонаправленно модулировать такие функции нейтрофилов как фагоцитоз и окислительная активность. При этом эффекты не зависят от размера наночастиц GO и типа ПЭГ. Решающим фактором является их концентрация.

Концентрация 5 мкг/мл всех четырех типов исследованных наночастиц P-GO не влияла на функциональную активность нейтрофилов человека и поэтому может считаться безопасной для применения в биомедицине.

## Список литературы / References

1. Бочкова М.С., Тимганова В.П., Храмцов П.В., Ужвиюк С.В., Шардина К.Ю., Нечаев А.И., Раев М.Б., Заморина С.А. Изучение влияния наночастиц оксида графена на люминол-зависимую хемилюминесценцию лейкоцитов человека // Медицинская иммунология, 2020, Т. 22. № 5. С. 977-986. Bochkova M.S., Timganova V.P., Khramtsov P.V., Uzhviyuk S.V., Shardina K.Yu., Nechaev A.I., Raev M.B., Zamorina S.A. Study of the graphene oxide nanoparticles effect on luminol-dependent chemiluminescence of human leukocytes. *Meditsinskaya immunologiya* = *Medical Immunology* (*Russia*), 2020, Vol. 22, no. 5, pp. 977-986. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-SOT-2051.

2. Babin K., Goncalves D.M., Girard, D. Nanoparticles enhance the ability of human neutrophils to exert phagocytosis by a Syk-dependent mechanism. Biochim. Biophys. *Acta, 2015, Vol. 1850, pp. 2276-2282.* 

3. Bellier N., Baipaywad P., Ryu N., Lee J.Y., Park H. Recent biomedical advancements in graphene oxide- and reduced graphene oxide-based nanocomposite nanocarriers. *Biomater. Res.*, 2022, Vol. 26, 65. doi: 10.1186/s40824-022-00313-2.

4. Bisso P.W., Gaglione S., Guimarães P.P.G., Mitchell M.J., Langer R. Nanomaterial Interactions with Human Neutrophils. ACS Biomater. *Sci. Eng.*, 2018, Vol. 4, no. 12, pp. 4255-4265.

5. Choe G., Kim S., Park J., Park J., Kim S., Kim Y.S., Lee J.Y. Anti-oxidant activity reinforced reduced graphene oxide/alginate microgels: Mesenchymal stem cell encapsulation and regeneration of infarcted hearts. *Biomaterials*, 2019, 119513. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119513.

6. Feng R., Yu F., Xu J., Hu X. Knowledge gaps in immune response and immunotherapy involving nanomaterials: Databases and artificial intelligence for material design. *Biomaterials, 2021, Vol. 266, 120469.* doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120469.

7. Ghosh S., Chatterjee K. Poly (Ethylene glycol) functionalized graphene oxide in tissue engineering: A review on recent advances. *Int. J. Nanomed.*, 2020, Vol. 15, pp. 5991-6006.

8. Ghulam A.N., dos Santos O.A.L., Hazeem L., Pizzorno Backx B., Bououdina M., Bellucci S. Graphene Oxide (GO) Materials-Applications and Toxicity on Living Organisms and Environment. *J. Funct. Biomater.*, 2022, Vol. 13, no. 2, 77. doi: 10.3390/jfb13020077.

9. Juarez-Moreno K., Ayala M., Vazquez-Duhalt R. Antioxidant Capacity of Poly(Ethylene Glycol) (PEG) as Protection Mechanism Against Hydrogen Peroxide Inactivation of Peroxidases. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, *Vol. 177, no. 6, pp. 1364-1373.* 

10. Keshavan S., Calligari P., Stella L., Fusco L., Delogu L.G., Fadeel B. Nano-bio interactions: a neutrophilcentric view. *Cell Death Dis.*, 2019, Vol. 10, 569. doi: 10.1038/s41419-019-1806-8.

11. Khramtsov P., Bochkova M., Timganova V., Nechaev A., Uzhviyuk S., Shardina K., Maslennikova I., Rayev M., Zamorina S. Interaction of Graphene Oxide Modified with Linear and Branched PEG with Monocytes Isolated from Human Blood. *Nanomaterials*, 2022, Vol. 12, no. 1, 126. doi: 10.3390/nano12010126.

12. Malisz K., Świeczko-Żurek B. Graphene Production and Biomedical Applications: A Review. *Crystals*, 2023, *Vol. 13*, 1413. doi: 10.3390/cryst13101413.

13. 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, no. 20, pp. 11744-11755.

14. Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Borisov A.G. Methods of estimation and the role of respiratory burst in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases. *Russian Journal of Infection and Immunity, 2017, Vol. 7, no. 4, pp. 327-340.* doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-327-340.

15. Xu Z., Wang S., Li Y., Wang M., Shi P., Huang X. Covalent Functionalization of Graphene Oxide with Biocompatible Poly(ethylene glycol) for Delivery of Paclitaxel. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2014, Vol. 6, pp. 17268-17276.

#### Авторы:

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

Ракутина М.Н. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной 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

Усанина Д.И. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной 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 клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, 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 клеточной иммунологии и нанобиотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Поступила 29.03.2024 Отправлена на доработку 31.03.2024 Принята к печати 26.04.2024 Authors:

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

**Rakutina M.N., Junior Research Associate, Laboratory** of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Usanina D.I., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Ecology and Genetic of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

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

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

Received 29.03.2024 Revision received 31.03.2024 Accepted 26.04.2024