

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК ГИБРИДОМЫ ВАРЗ

Лазарев С.С.^{1,2}, Бочкова М.С.^{1,2}, Тимганова В.П.², Раев М.Б.^{1,2}

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН, г. Пермь, Россия

² ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Резюме. Оксид графена (ОГ) является перспективным материалом для применения в медицине и биотехнологии. Тем не менее не так много известно о его влиянии на организм. Еще меньше данных доступно о влиянии ОГ на клеточные линии, применяемые в биотехнологическом производстве.

Целью нашего исследования стало изучение процессов взаимодействия наночастиц ОГ с клетками гибридомы ВАРЗ, производящей IgG, специфичные к трофобластическому бета-1-гликопротеину человека, в условиях *in vitro*. Рассматривали влияние наночастиц ОГ на жизнеспособность клеток, одновременно оценивая их интернализацию. В работе использовали наночастицы ОГ разных размеров с поверхностью, функционализированной линейным или разветвленным ПЭГ (ОГ-ПЭГ). Количество покрывающего ПЭГ составило ~20% (по массе). В исследовании применяли две рабочих концентрации наночастиц ОГ: 5 мкг/мл и 25 мкг/мл. Клетки культивировали в 48-луночном планшете в бессывороточной среде DCCM-1 в присутствии наночастиц ОГ. Культивирование проводили в течение суток при 37 °С и 5% CO₂. Жизнеспособность оценивали на проточном цитометре с помощью окрашивания клеток красителем Zombie Aqua (ZA). Интернализацию (адгезию) частиц фиксировали на проточном цитометре по флуоресценции ОГ в пробах ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ нм}$). Одновременно визуализировали взаимодействие клеток с наночастицами ОГ в системе EVOS M5000, представляющей собой инвертированный флуоресцентный микроскоп.

При изучении влияния наночастиц ОГ на клетки гибридомы ВАРЗ было показано, что частицы оказывали цитотоксический эффект в высокой концентрации (25 мкг/мл). Наибольший цитотоксический эффект наблюдался у частиц, покрытых линейным ПЭГ. При оценке интернализации (адгезии) частиц клетками гибридомы ВАРЗ обнаружено, что в концентрации 5 мкг/мл степень интернализации (адгезии) частиц была значительно ниже, чем при концентрации 25 мкг/мл. Интернализация (адгезия) частиц малого размера осуществлялась клетками более активно, чем крупных частиц. Их цитотоксический эффект также был выше, чем у крупных частиц. В целом цитотоксичность наночастиц ОГ уменьшается с увеличением их размера, учитывая тот факт, что средний эффективный диаметр частиц, покрытых разветвленным ПЭГ, выше, чем у аналогичных, покрытых линейным ПЭГ. Таким образом, полученные данные позволяют связать оказываемый наночастицами ОГ цитотоксический эффект с их интернализацией (адгезией) клетками. В целом впервые изучены некоторые аспекты взаимодействия наночастиц ОГ с клетками гибридомы.

Ключевые слова: оксид графена, модификация поверхности наночастиц, пегилированные наночастицы оксида графена, жизнеспособность, поглощение, гибридома ВАРЗ

Адрес для переписки:

Лазарев Сергей Станиславович
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (919) 712-70-30.
E-mail: lasest@vk.com

Address for correspondence:

Lazarev Sergey S.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Golev str., 13.
Phone: 7 (919) 712-70-30.
E-mail: lasest@vk.com

Образец цитирования:

С.С. Лазарев, М.С. Бочкова, В.П. Тимганова,
М.Б. Раев «Влияние наночастиц оксида графена
на жизнеспособность клеток гибридомы ВАРЗ»
// Российский иммунологический журнал, 2022. Т. 25,
№ 3. С. 245–250. doi: 10.46235/1028-7221-1148-EOG
© Лазарев С.С. и соавт., 2022

For citation:

S.S. Lazarev, M.S. Bochkova, V.P. Timganova, M.B. Rayev
“Effect of graphene oxide nanoparticles on viability of VAP3
hybridoma cells”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy
Immunologicheskii Zhurnal, 2022, Vol. 25, no. 3, pp. 245–250.
doi: 10.46235/1028-7221-1148-EOG
DOI: 10.46235/1028-7221-1148-EOG

EFFECT OF GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON VIABILITY OF BAP3 HYBRIDOMA CELLS

Lazarev S.S.^{a, b}, Bochkova M.S.^{a, b}, Timganova V.P.^b, Rayev M.B.^{a, b}

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

^b Perm State University, Perm, Russian Federation

Abstract. Graphene oxide (GO) is a promising material, which is likely to find applications in the fields of medicine and biotechnology. However, the current knowledge of its influence on human organism is limited. Even less information is available on the effects of GO on the cell lines widely used in biotechnology. The aim of this work is to describe the interaction between GO nanoparticles and BAP3 hybridoma cells which produce anti-human-PSG1 IgG, *in vitro*. We studied the effect of GO nanoparticles on cell viability and the intensity of internalization (adhesion) of nanoparticles by the cells. We used GO nanoparticles of different size, with surface being functionalized by linear or branched PEG (GO-PEG). The PEG coating level was 20% (by mass). The following nanoparticle concentrations were used: 5 µg/mL and 25 µg/mL. The BAP3 cells were cultured in a 48-well cell culture plates in serum-free DCCM-1 media in the presence of GO nanoparticles. The cells were cultured for 24 hours at 37 °C and 5% CO₂. Cell viability was assessed by a flow cytometer utilizing Zombie Aqua (ZA) staining. Internalization (adhesion) of nanoparticles was monitored using a flow cytometer by GO fluorescence in the samples (λ_{ex} = 488 nm). Moreover, interactions between hybridoma cells and GO nanoparticles were visualized by EVOS M5000 visualization system, which included an inverted fluorescent microscope.

We demonstrated that GO nanoparticles possess a cytotoxic effect when applied at high concentration (25 µg/mL). The highest cytotoxic effect is caused by GO nanoparticles coated with linear PEG. The degree of nanoparticle internalization (adhesion) was shown to be significantly lower when the particles were present at lower (5 µg/mL) concentration. Internalization (adhesion) of nanoparticles of smaller size was more abundant. Furthermore, these nanoparticles were shown to have a stronger cytotoxic effect compared to larger particles. In general, cytotoxicity of GO nanoparticles decreases with increasing size, which is especially evident if the fact that the mean effective diameter of the nanoparticles coated with branched PEG is considered larger than their linear PEG-coated counterparts. The data obtained allow us to draw a correlation between the cytotoxic effect of GO nanoparticles and the level of their internalization (adhesion) by the cells. In general, this work concerns some novel aspects of interaction between GO nanoparticles and hybridoma cells.

Keywords: graphene oxide, nanoparticle surface modification, PEG-coated graphene oxide nanoparticles, cell viability, internalization, BAP3 hybridoma

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 19-15-00244-П.

Введение

Благодаря своим уникальным свойствам графен все чаще находит применение в биомедицине. В частности, оксид графена (ОГ) в настоящее время исследуется для применения в таких сферах биомедицины, как доставка лекарств и медицинская визуализация [5]. Применение материалов на основе графена в медицине требует тщательной оценки их биосовместимости и детального понимания их взаимодействия с клетками. Как известно, различные поверхностные модифика-

ции ОГ могут снижать цитотоксические эффекты в отношении клеток [2]. Кроме того, одним из самых распространенных материалов для функционализации ОГ является полиэтиленгликоль (ПЭГ) [6]. В нашей работе мы использовали частицы ОГ, модифицированного разветвленным и неразветвленным ПЭГ.

Данное исследование является частью большого проекта по изучению биосовместимости наночастиц ОГ с клетками иммунной системы [https://grant.rscf.ru/prjcard_int?19-15-00244]. Гибридомы используются для продукции моноклональных антител определенной специфичности. Гибридома BAP3 (Genovac, Германия) была получена из плазматических клеток селезенки мыши

и продуцирует IgG к трофобластическому бета-1-гликопротеину человека. Известно, что клетки гибридомы быстро пролиферируют и обладают характеристиками, сходными с плазматическими клетками мыши [4]. Таким образом, они представляют собой адекватную модель для изучения влияния различных веществ на плазматические клетки.

Целью нашего исследования стало изучение процессов взаимодействия наночастиц ОГ с клетками гибридомы ВАРЗ в условиях *in vitro*. В работе применяли наночастицы разного размера, функционализованные линейным или разветвленным ПЭГ, изучая как жизнеспособность клеток, так и поглощение частиц этими клетками.

Материалы и методы

Функционализация наночастиц ОГ

В работе использовались наночастицы ОГ размерами 100-200 нм (ОГм) и 1-5 мкм (ОГб) (Ossila Ltd, Великобритания), которые покрывались линейным (П) и разветвленным (рП) полиэтиленгликолем (ПЭГ). Процедуры модификации и характеристика наночастиц описаны нами ранее [3]. Таким образом, в работе применялись следующие частицы: П-ОГм ($\varnothing 184 \pm 73$ нм), рП-ОГм ($\varnothing 287 \pm 52$ нм), П-ОГб ($\varnothing 569 \pm 14$ нм), рП-ОГб ($\varnothing 1376 \pm 48$ нм).

Подготовка культуры клеток гибридомы ВАРЗ

Для исследования *in vitro* использовали клетки гибридомы ВАРЗ (Genovac, Германия), производящей IgG, специфичные к трофобластическому бета-1-гликопротеину человека. Клетки гибридомы ВАРЗ хранили в криохранилище при температуре жидкого азота (количество клеток в каждой пробирке – $3-5 \times 10^6$) в среде заморозки (эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) (ВИ, Израиль) + 10% диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma, США)). Клетки были разморожены согласно протоколу производителя (Genovac, Германия). После размораживания клетки были перенесены в 48-луночный планшет (Corning, США) для культивирования в среде роста (среда DMEM с высоким содержанием глюкозы (ВИ, Израиль) + 12% (ЭТС) (ВИ, Израиль)) в течение 48 часов в CO₂-инкубаторе IG-150 Jouan (Франция) при концентрации CO₂ 5%. После этого клетки были перенесены в T75 культуральные фласки (Cellstar®, Германия) с бессывороточной средой DCCM-1 (ВИ, Израиль) с добавлением 3,3 мМ L-глутамин, 67 Ед/мл пенициллина, 0,07 мг/мл стрептомицина, 0,17 мкг/мл амфотерицина В, 1 мМ пирувата натрия (ВИ, Израиль).

Клетки культивировали во флашках в течение недели для формирования стабильной культуры

перед внесением наночастиц ОГ. Ежедневно проводили подсчет количества клеток, проверяли их жизнеспособность, при необходимости производили замену среды. Подсчет и проверку жизнеспособности клеток осуществляли в гемцитометре Нейбауэра, в тесте с трипановым синим (0,2%; Sigma, США).

Оценка взаимодействия клеток гибридомы с наночастицами ОГ

Для оценки влияния ОГ на жизнеспособность гибридомы ВАРЗ, клетки вносили в концентрации 2×10^5 кл/мл в 48-луночные планшеты (Corning, США). Далее в лунки добавляли наночастицы ОГ разных размеров, функционализованные линейным или разветвленным ПЭГ (П-ОГм, рП-ОГм, П-ОГб, рП-ОГб) до конечных концентраций 5 и 25 мкг/мл. Культуры инкубировали в течение суток при 37 °С и 5% CO₂ (для оценки влияния ОГ на жизнеспособность клеток гибридомы). Для каждого вида наночастиц ОГ делали три повторности культуры, контролем служила культура клеток без наночастиц ОГ.

После инкубации была произведена оценка жизнеспособности клеток с помощью суправитального красителя Zombie Aqua (ZA) на проточном цитометре (Cytotflex S, Beckman Coulter, США). Кроме того, оценивали количество клеток, интернализовавших (адгезировавших) наночастицы ОГ, по интенсивности флуоресценции клеток ($\lambda_{ex} = 488$ nm; bandpass filter: 720-840 nm; фильтр для красителя PC-7). Также нами была использована система визуализации (EVOS M5000, Thermo Fisher Scientific, США) для получения снимков каждого типа культур в лунках.

Обработку данных проточной цитометрии осуществляли в программе KALUZA Analysis Software (Beckman Coulter, США), результаты выражали в виде процента живых (не окрашенных Zombie Aqua) клеток в гейте целевой популяции, и в виде процента клеток, флуоресцирующих в канале для красителя PC-7 (при оценке интернализации/адгезии) наночастиц.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью Graphpad Prism 8. Данные представлены в арифметических средних со стандартными отклонениями ($M \pm \sigma$), достоверность различий оценивали с использованием критерия ANOVA с тестом для множественных сравнений Сидака. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для частиц в высокой концентрации был вычислен коэффициент R² (Пирсона) для корреляции между размером частиц и долей жизнеспособных клеток.

Результаты и обсуждение

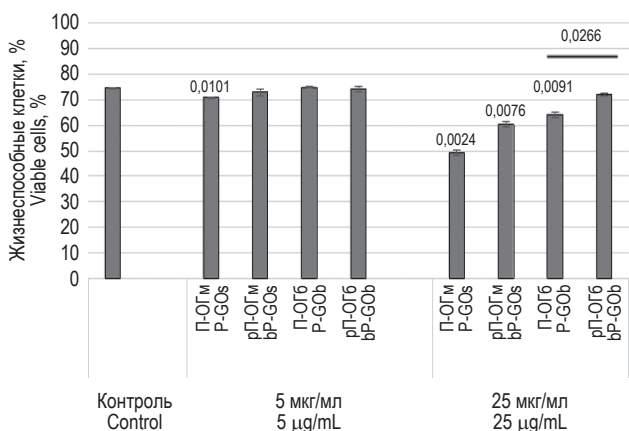
1. Обнаружено, что частицы П-ОГм в низкой и высокой концентрациях действовали цитотоксически на клетки гибридомы ВАРЗ, так как количество живых клеток в культурах статистически значимо снижалось (рис. 1А). Остальные частицы оказывали цитотоксический эффект только в высокой концентрации 25 мкг/мл. Интересно, что ОГ в высокой концентрации, функционализированный разветвленным ПЭГ (рП-ОГм и рП-ОГб), оказывал меньший цитотоксический эффект по сравнению с ОГ, покрытым линейным ПЭГ (рис. 1А).

Таким образом, наночастицы ОГ способны оказывать цитотоксический эффект на клетки гибридомы ВАРЗ в высокой концентрации (25 мкг/мл), независимо от размера и типа ПЭГ, которыми они покрыты. В то же время только частицы малого размера (П-ОГм) способны оказывать цитотоксический эффект в низкой концентрации (5 мкг/мл). Для частиц в высокой концентрации коэффициент R^2 для корреляции между размером частиц и долей жизнеспособных клеток в культуре равен 0,83 ($p < 0,05$). Цитоток-

сичность частиц уменьшается с увеличением их размера.

При оценке интернализации (адгезии) частиц клетками гибридомы ВАРЗ обнаружено, что в концентрации 5 мкг/мл частицы практически не интернализировались, однако концентрация наночастиц ОГ 25 мкг/мл способствовала их интенсивной интернализации (адгезии) клетками гибридомы, о чем говорит повышение процента флуоресцирующих клеток (рис. 1Б). Однако тип ПЭГ, использованный для покрытия частиц ОГ, не влиял на этот параметр. Известно, что опухолевые линии клеток, могут интернализировать наночастицы различными способами [1]. Статистически значимые различия в процентах флуоресцирующих клеток между культурами с ОГ с одинаковым покрытием, но разными размерами, говорит о том, что мелкие частицы клетками гибридомы адгезируются/интернализуются лучше, чем большие (рис. 1Б). Цитотоксический эффект наночастиц мы связываем с ER-стрессом, вызванный интернализацией наночастиц клетками гибридомы.

А (A)



Б (B)

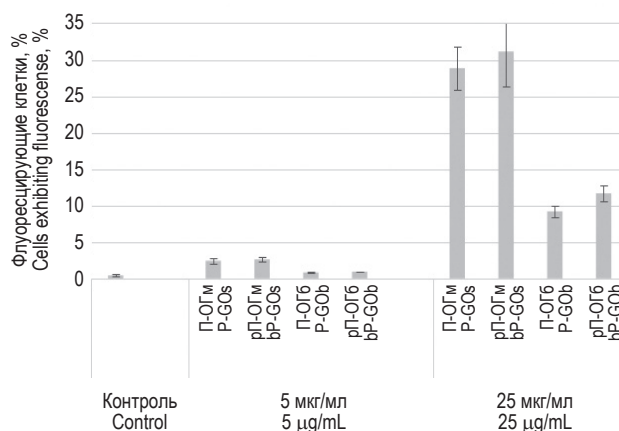


Рисунок 1. Взаимодействие наночастиц ОГ с клетками гибридомы

Примечание. А – процент жизнеспособных клеток в культурах гибридомы ВАРЗ с разными видами наночастиц ОГ в двух концентрациях. Для всех групп $n = 3$. Числами обозначены значения $p < 0,05$ по отношению к контролю без ОГ и по отношению к частицам ОГ, покрытым неразветвленным ПЭГ.

Б – Процент флуоресцирующих (интернализовавших/адгезирующих ОГ) клеток в суточных культурах клеток гибридомы ВАРЗ. Для всех групп $n = 3$. Числами обозначены значения $p < 0,05$ (ANOVA) показателей культур с большими наночастицами ОГ по отношению к культурам с малыми наночастицами ОГ с аналогичным покрытием (видом ПЭГ).

Figure 1. Interaction of GO nanoparticles and hybridoma cells

Note. (A) Percentage of viable BAP3 hybridoma cells in cultures with different types of GO nanoparticles added in two concentrations. For all groups $n = 3$. P-values < 0.05 as compared to the control group and to the GO nanoparticles functionalized with linear PEG are indicated by numbers.

(B) Percentage of cells exhibiting fluorescence in 24 h BAP3 hybridoma cell cultures. Note: for all groups $n = 3$. P-values indicate the difference (ANOVA) between samples with large nanoparticles and samples with small nanoparticles of the same PEG coating type.

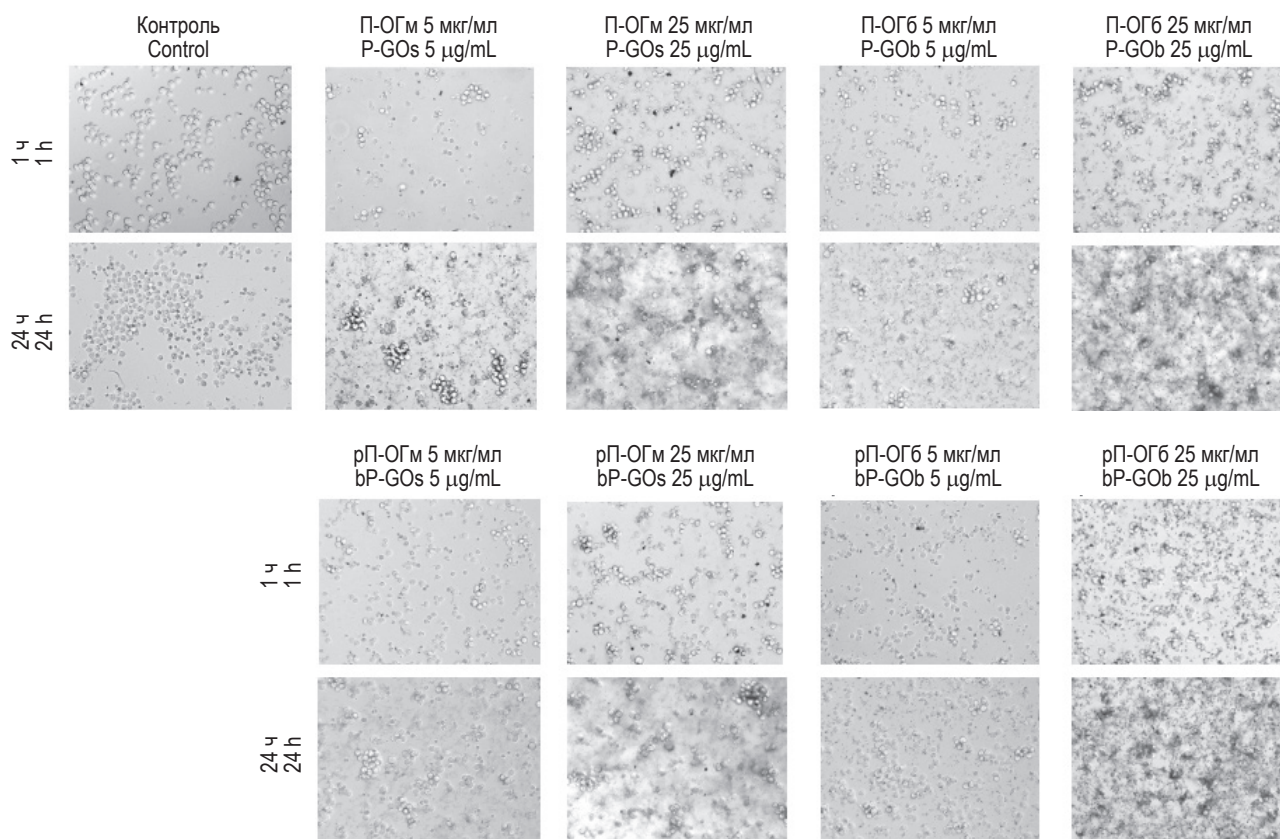


Рисунок 2. Визуализация взаимодействия клеток гибридомы ВАР3 и наночастиц ОГ

Примечание. П – линейный ПЭГ, рП – разветвленный ПЭГ, ОГм – частицы малого размера, ОГб – частицы большого размера.

Figure 2. Visualization of interaction between BAP3 hybridoma and GO nanoparticles

Note. P, linear PEG; bP, branched PEG; GOs, small particles; GOb, large particles.

Заключение

При изучении влияния наночастиц ОГ на клетки гибридомы ВАР3 было показано, что частицы оказывали цитотоксический эффект в высокой концентрации 25 мкг/мл, при этом цитотоксический эффект уменьшался с увеличением размера частиц. При оценке интернализации (адгезии) частиц клетками гибридомы ВАР3 обнаружено, что в концентрации 5 мкг/мл части-

цы практически не интернализировались, однако, концентрация наночастиц ОГ 25 мкг/мл способствовала их интенсивной интернализации (адгезии) клетками гибридомы. Таким образом, полученные данные позволяют связать оказываемый наночастицами ОГ цитотоксический эффект с их интернализацией (адгезией) клетками. В целом впервые изучены некоторые аспекты взаимодействия наночастиц ОГ с клетками гибридомы.

Список литературы / References

1. Behzadi S., Serpooshan V., Tao W., Hamaly M.A., Alkawareek M.Y., Dreaden E.C., Brown D., Alkilany A.M., Farokhzad O.C., Mahmoudi M. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.*, 2017, Vol. 46, no. 14, pp. 4218-4244.
2. de Melo-Diogo D., Lima-Sousa R., Alves C.G., Costa E.C., Louro R.O., Correia I.J. Functionalization of graphene family nanomaterials for application in cancer therapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2018, Vol. 171, pp. 260-275.
3. 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.

4. Mitra S., Tomar P.C. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 2021, Vol. 19, no. 1, 159. doi: 10.1186%2Fs43141-021-00264-6.
5. Shareena T.P.D., McShan D., Dasmahapatra A.K., Tchounwou P.B. A review on graphene-based nanomaterials in biomedical applications and risks in environment and health. *Nanomicro Lett.*, 2018, Vol. 10, no. 3, 53. doi: 10.1007/s40820-018-0206-4.
6. Singh D.P., Herrera C.E., Singh B., Singh S., Singh R.K., Kumar R. Graphene oxide: An efficient material and recent approach for biotechnological and biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2018, Vol. 86, pp. 173-197.

Авторы:

Лазарев С.С. — инженер лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН; бакалавр кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН; старший преподаватель кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

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

Раев М.Б. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии Института экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиала ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» УрО РАН; профессор кафедры микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГАОУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия

Authors:

Lazarev S.S., Engineer, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center; Bachelor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University, Perm, Russian Federation

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

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

Rayev M.B., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center; Professor, Department of Microbiology and Immunology, Perm State University, Perm, Russian Federation