

УДК 612.017: 612.018

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ПЕГИЛИРОВАННОГО ОКСИДА ГРАФЕНА НА МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT

© 2023 г. В. П. Тимганова^{1,*}, В. В. Власова¹, М. С. Бочкова^{1,2}, К. Ю. Шардина¹, С. В. Ужвиюк¹, П. В. Храпцов^{1,2}, М. Б. Раев^{1,2}, С. А. Заморина^{1,2}

Представлено академиком РАН В.А. Черешневым

Поступило 26.04.2023 г.

После доработки 20.05.2023 г.

Принято к публикации 30.05.2023 г.

Исследовали влияние наночастиц оксида графена (ОГ) размером 100–200 нм, покрытых линейным (лП-ОГ) и разветвленным (рП-ОГ) полиэтиленгликолем, в концентрациях 5 и 25 мкг/мл на метаболизм клеток опухолевой линии Jurkat. Установлено, что наночастицы лП-ОГ в концентрации 25 мкг/мл способны усиливать базальный гликолиз клеток Т-лимфоцитарной опухолевой линии Jurkat, а лП-ОГ и рП-ОГ в этой же концентрации — снижать показатели компенсаторного гликолиза. Несмотря на это, наночастицы ОГ, покрытые линейным и разветвленным ПЭГ, в концентрации 5 мкг/мл не оказывают выраженных эффектов на окислительное фосфорилирование и гликолиз клеток Jurkat, а следовательно, могут быть безопасными и в отношении активированных Т-клеток.

Ключевые слова: наночастицы пегилированного оксида графена, опухолевая линия Jurkat, метаболизм, митохондриальное дыхание, аэробный гликолиз

DOI: 10.31857/S2686738923600292, **EDN:** TASLVY

Оксид графена обладает исключительными физическими и электрохимическими свойствами, благодаря которым он имеет широкий спектр применения в биомедицине [1]. Наночастицы из этого материала могут применяться для изготовления биосенсоров, систем доставки лекарств/генов и инструментов для диагностики и лечения рака [2, 3]. Однако наночастицы оксида графена, как и любые частицы небиологической природы, могут обладать цитотоксичностью или другими нежелательными эффектами (проапоптотическое действие, генотоксичность, эпигенетическая токсичность) в отношении клеток организма. Выраженность и направленность эффектов наночастиц на клетки зависят от множества факторов, таких как концентрация, время воздействия, форма и размер частиц, тип их функционализации, способность образовывать белковую корону. Важно подчеркнуть, что для всестороннего исследования наночастиц с целью их дальнейшего применения в биомедицине, необходимо понять, способны ли условно не цитотоксиче-

ские их концентрации повлиять на нормальное функционирование разных видов иммунных клеток, в частности, на метаболизм.

Т-лимфоциты играют центральную роль в адаптивном иммунном ответе. Их дифференцировка сопровождается пролиферацией, ростом и одновременно осуществлением эффекторной функции, в связи с чем возрастает потребность в субстратах, необходимых для синтеза липидов мембран, нуклеиновых кислот и белков. В активированных Т-лимфоцитах обеспечение этих потребностей реализуется за счет усиления аэробного гликолиза — метаболического пути, используемого большинством раковых клеток [4–6]. С этой точки зрения, иммортализованная опухолевая Т-клеточная линия Jurkat является хорошей моделью для изучения функций Т-лимфоцитов. Клетки линии Jurkat используются как для изучения фундаментальных аспектов Т-клеточного сигналинга и противоинфекционного иммунитета, так и для прикладных исследований, направленных на разработку противоопухолевых препаратов [7].

Целью работы было исследование влияния покрытых разными видами ПЭГ наночастиц оксида графена на показатели метаболизма клеток опухолевой Т-клеточной линии Jurkat.

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН — филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

*e-mail: timganovavp@gmail.com

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наночастицы оксида графена: В экспериментах использовали наночастицы оксида графена (ОГ) размером 100–200 нм, покрытые полиэтиленгликолем (ПЭГ) двух видов. Модификацию наночастиц ОГ (Ossila Ltd., Великобритания) проводили путем ковалентного связывания аминогрупп ПЭГ-NH₂ (линейный ПЭГ) и 8arm-ПЭГ-NH₂ (разветвленный ПЭГ) с поверхностными карбоксильными группами ОГ [8]. Наночастицы добавляли к исследуемым клеткам до получения конечных концентраций частиц 5 и 25 мкг/мл. В статье наночастицы, покрытые линейным ПЭГ, обозначены как лП-ОГ, а разветвленным ПЭГ, как рП-ОГ.

Объект исследования: Объектом исследования были клетки Т-лимфоцитарной опухолевой линии Jurkat 5332. (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

Клетки Jurkat за неделю до эксперимента вводили из глубокой заморозки в экспоненциальную фазу роста. В день эксперимента клетки ресуспендировали в среде XF RPMI Medium (“Agilent Technologies”, США), содержащей 10 мМ глюкозы (“Sigma”, США), 2 мМ глутамина (“Диа-М”, Россия) и 1 мМ пирувата натрия (“Sigma”, США). Затем по 1×10^5 клеток вносили в лунки планшета (“Agilent Technologies”, США), предварительно покрытые поли-D-лизин (50 мкг/мл), и центрифугировали в течение 2 мин при 200 g для формирования монослоя. В контрольных образцах объем лунки доводили до 150 мкл средой, в исследуемых – средой, содержащей наночастицы оксида графена. Планшет инкубировали при +37°C в течение 120 мин. Эксперимент повторяли 4 раза в разные дни.

Активность митохондриального дыхания и аэробного гликолиза определяли с использованием анализатора Seahorse XFe96 (“Agilent Technologies”, США) по показателям скорости потребления кислорода (англ. oxygen consumption rate – OCR) и скорости ацидификации среды (англ. extracellular acidification rate – ECAR). Измерения производили на базальном уровне, затем последовательно вносили ингибиторы дыхательной цепи митохондрий: олигомицин в конечной концентрации 2.5 мкМ, карбонил цианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон (англ. carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone – FCCP; 2 мкМ), ротенон и антимицин А (0.5 мкМ). Перечисленные реагенты приобретены в “Agilent Technologies”, США. Анализ данных производили с использованием программного обеспечения Wave Desktop (“Agilent Technologies”, США).

Митохондриальное дыхание. Для исследования влияния наночастиц ОГ на интенсивность окислительного фосфорилирования определяли следующие показатели: немитохондриальное ды-

хание (минимальное значение OCR после инъекции ротенона/антимицина А); базальная скорость потребления кислорода (последняя OCR перед инъекцией олигомицина – немитохондриальное дыхание), максимальная скорость потребления кислорода (первое измерение после инъекции FCCP – немитохондриальное дыхание).

Гликолиз. Для определения гликолиза оценивали скорость выброса протонов (Proton efflux rate, PER), показатель внеклеточного закисления, который учитывает буферную емкость среды и геометрию планшета [9]. Далее была определена величина митохондриального PER: CCF (CO₂ contribution factor – коэффициент, учитывающий вклад CO₂ в изменение pH среды)* базальная скорость потребления кислорода, в котором CCF для планшетов XFe96 определяется как 0,61. Путем вычитания митохондриальной PER из общей PER рассчитывали базальную гликолитическую PER (базальный гликолиз); затем определяли максимальную гликолитическую PER (гликолитическая PER после инъекции ротенона/антимицина А), а также компенсаторный гликолиз (максимальная гликолитическая PER – базальный гликолиз).

Статистическую обработку полученных данных проводили в программе GraphPad Prism 8 при помощи критерия Краскела–Уоллиса. Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (Q1 – Q3)). Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что наночастицы ОГ не оказывали влияния на скорость потребления кислорода (OCR). Однако в пробах с добавлением наночастиц лП-ОГ в концентрации 25 мкг/мл наблюдалась тенденция к увеличению базальной и максимальной OCR (рис. 1).

Влияние наночастиц графена на гликолитическую активность Jurkat выразилось в повышении базального гликолиза под действием наночастиц лП-ОГ в концентрации 25 мкг/мл (рис. 2 а). Однако показатели максимального гликолиза (рис. 2 б) при воздействии частиц имели выраженную тенденцию к снижению.

Компенсаторный гликолиз – увеличение скорости гликолиза, направленное на удовлетворение энергетических потребностей клеток в присутствии ингибиторов митохондриального дыхания. Этот параметр указывает на способность клеток переключать метаболизм в условиях стресса.

Способность к компенсаторному гликолизу достоверно подавлялась наночастицами обоих видов в больших концентрациях (рис. 2 в).

Таким образом, только наночастицы лП-ОГ в концентрации 25 мкг/мл стимулируют базальный

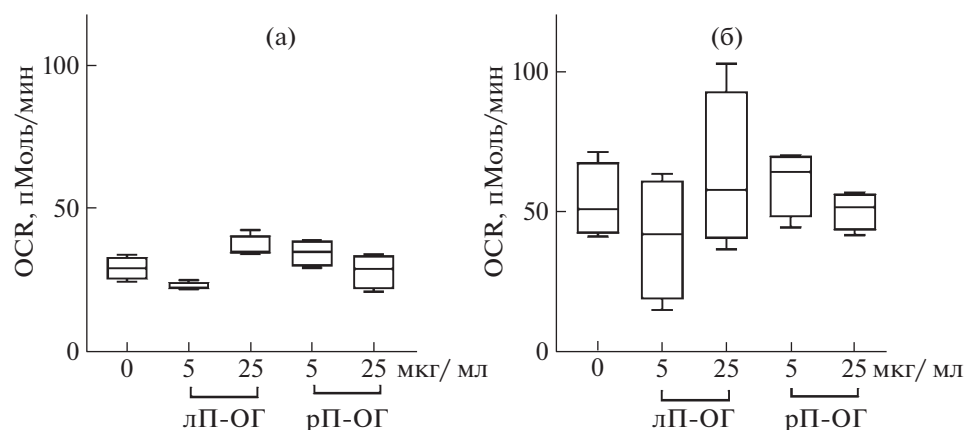


Рис. 1. Базальная (а) и максимальная (б) скорости потребления кислорода (OCR) клеток Jurkat при добавлении наночастиц оксида графена.

Примечание: $n = 4$; ось x – вид и концентрации наночастиц; ось y – скорость потребления кислорода (OCR). Представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные размахи (прямоугольники), максимумы и минимумы (“усы”).

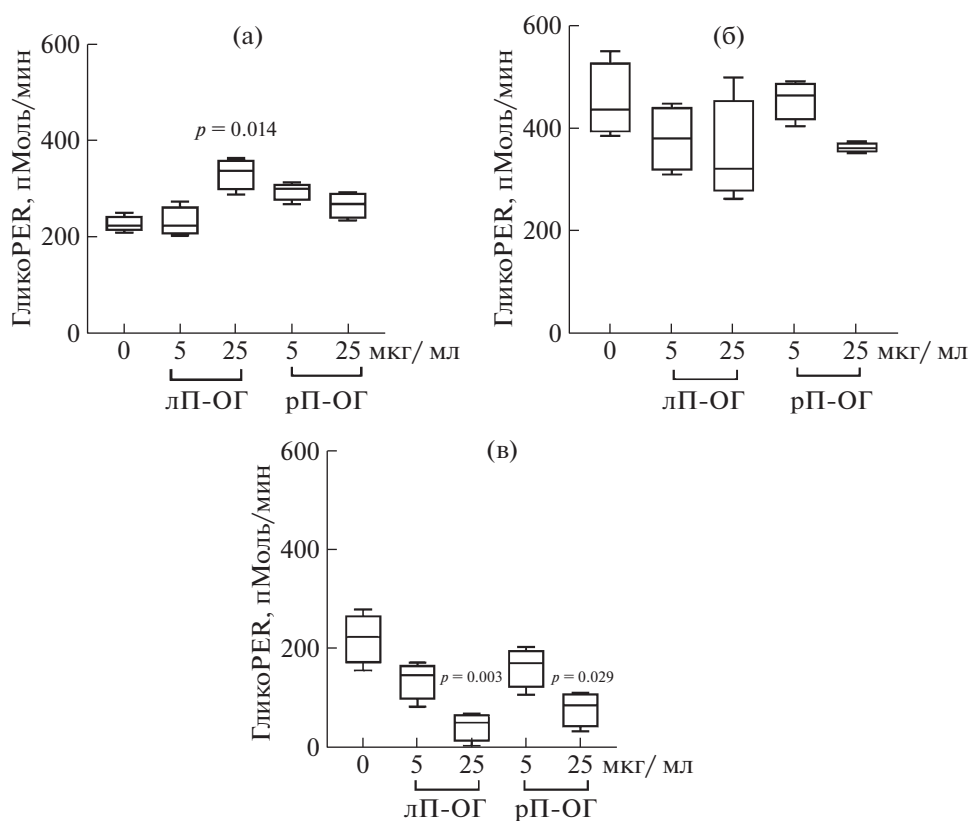


Рис. 2. Показатели базального (а), максимального (б) и компенсаторного (в) гликолиза клеток Jurkat при добавлении наночастиц оксида графена.

Примечание: $n = 4$; ось x – вид и концентрации наночастиц; ось y – гликолитическая скорость выброса протонов (glycoPER). Представлены медианы (горизонтальные линии), интерквартильные размахи (прямоугольники), максимумы и минимумы (“усы”). На диаграммах представлены значения $p < 0.05$ по отношению к контролю (0 мкг/мл).

гликолиз клеток Jurkat, но при этом оба вида частиц в высокой концентрации снижают способность клеток к компенсаторному гликолизу. Вероятно, это происходит из-за избыточной активации, при-

водящей к превышению резервных возможностей клетки. Важно подчеркнуть, что все наблюдаемые изменения метаболизма произошли всего за два часа совместной инкубации клеток исследуе-

мой опухолевой линии с частицами. Ранее при помощи системы прижизненного наблюдения Cell IQ нами было обнаружено, что эти же наночастицы ОГ за 24 ч подавляют рост клеток Jurkat, снижая прирост их клеточной массы [10], однако, сейчас мы видим, что критичные изменения начинаются намного раньше.

В целом усиление аэробного гликолиза связывают с инициацией опухолевой трансформации клеток, а также с ростом, развитием и метастазированием опухоли [11]. Экстраполируя данные, касающиеся клеток Jurkat, на нормальные Т лимфоциты человека, можно назвать данный эффект нежелательным.

Из вышесказанного следует, что наночастицы лП-ОГ и рП-ОГ в концентрации 5 мкг/мл, вероятно, являются безопасными как в отношении нормальных клеток организма, так и в отношении раковых клеток, чувствительных к метаболическим воздействиям.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-15-00244-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Priyadarsini S., Mohanty S., Mukherjee S., et al. Graphene and graphene oxide as nanomaterials for medicine and biology application // *Journal of Nanostructure in Chemistry*. 2018. № 8. P. 123–137.
2. Zare P., Aleemardani M., Seifalian A., et al. Graphene Oxide: Opportunities and Challenges in Biomedicine // *Nanomaterials (Basel)*. 2021. V. 11. № 5. 1083.
3. Zhang L., Xia J., Zhao Q., et al. Functional Graphene Oxide as a Nanocarrier for Controlled Loading and Targeted Delivery of Mixed Anticancer Drugs // *Small*. 2010. № 6. P. 537–544.
4. Vander Heiden M.G., Cantley L.C., Thompson C.B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation // *Science*. 2009. V. 324. № 5930. P. 1029–1033.
5. Cantor J.R., Sabatini D.M. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces // *Cancer Discovery*. 2012. V. 2. № 10. P. 881–898.
6. Шейбак В.М., Павлюковец А.Ю. Биохимическая гетерогенность Т-лимфоцитов // *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2018. Т. 17. № 6. С. 7–17.
7. Montano M. *Translational Biology in Medicine*. Woodhead Publishing. Cambridge. 2015.
8. Khramtsov P.V., Bochkova M.S., Timganova V.P. et al. Interaction of Graphene Oxide Modified with Linear and Branched PEG with Monocytes Isolated from Human Blood // *Nanomaterials*. 2021. V. 12. e:126.
9. Romero N., Swain P., Neilson A., et al. Improving Quantification of Cellular Glycolytic Rate Using Agilent Seahorse XF Technology (White Paper) Agilent Technologies, Inc (2017) (5991-7894EN).
10. Zamorina S.A., Khramtsov P.V., Rayev M.B. et al. Graphene Oxide Nanoparticles Interaction with Jurkat Cell Line in Cell-IQ System. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2021. V. 501. P. 438–443.
11. Chang X., Liu X., Wang H., et al. Glycolysis in the progression of pancreatic cancer // *American Journal of Cancer Research*. 2022. V. 12. № 2. P. 861–872.

EFFECT OF PEGYLATED GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON THE METABOLISM OF JURKAT CELLS

V. P. Timganova^{a, #}, V. V. Vlasova^a, M. S. Bochkova^{a, b}, K. Yu. Shardina^a,
S. V. Uzhviyuk^a, P. V. Khramtsov^{a, b}, M. B. Rayev^{a, b}, and S. A. Zamorina^{a, b}

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

^b*Perm State National Research University, Perm, Russian Federation*

[#]*e-mail: timganovavp@gmail.com*

Presented by Academician of the RAS V.A. Chereshev

The effect of graphene oxide (GO) nanoparticles of 100–200 nm size coated with linear (LP-GO) and branched (BP-GO) polyethylene glycol at concentrations of 5 and 25 µg/mL on the metabolism of Jurkat tumor cells was studied. It was found that LP-GO nanoparticles at a concentration of 25 µg/mL can enhance basal glycolysis of Jurkat T lymphocyte tumor cell line cells, while LP-GO and BP-GO at the same concentration can reduce the indicators of compensatory glycolysis. Despite this, GO nanoparticles coated with linear and branched PEG at a concentration of 5 µg/mL do not have pronounced effects on oxidative phosphorylation and glycolysis of Jurkat cells and could therefore be safe for activated T cells.

Keywords: PEGylated graphene oxide nanoparticles, Jurkat cell line, metabolism, mitochondrial respiration, aerobic glycolysis