

УДК 571.27; 612.017.11
DOI: <https://doi.org/10.17721/1728.2748.2025.102.59-65>

Іван СТУПАК¹, асп.
ORCID ID: 0000-0003-1035-1659
e-mail: ivan.stupak@knu.ua

Людмила ОСТАПЧЕНКО¹, д-р біол. наук
ORCID ID: 0000-0001-7181-6048
e-mail: ostapchenko@knu.ua

Людмила ГАРМАНЧУК¹, д-р біол. наук
ORCID ID: 0000-0002-1527-2346
e-mail: liudmylagarmanchuk@knu.ua

Олександр ГОРБАЧ², канд. біол. наук
ORCID ID: 0000-0003-2922-6049
e-mail: horbach.alex@gmail.com

Катерина СЕНЧА-ГЛЕВАЦЬКА³, канд. хім. наук
ORCID ID: 0000-0003-4850-944X
e-mail: ksencha.h@gmail.com

¹ Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

² Національний Інститут раку, Київ, Україна

³ Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, Київ, Україна

ОЦІНКА ВПЛИВУ ОКСИДУ ГРАФЕНУ НА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА ФЕНОТИПОВІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІТИН МІКРОГЛІЇ ЛІНІЇ BV-2

Вступ. *Визначення ефективності терапії патологій головного мозку залежить від багатьох чинників, зокрема від клітин глії, які є структурними та морфофункціональними складниками гематоенцефалічного бар'єра й можуть бути залучені до низки патологічних станів центральної нервової системи. У клітинній лінії мишачого походження BV-2 профіль антигенів, антимікробна та фагоцитарна активність майже аналогічні макрофагам організму, тому їх використовують як альтернативну модельну систему в дослідженнях нейродегенеративних захворювань. Потенційними лікарськими засобами або їхніми носіями на різних рівнях впливу на біологічні об'єкти є вуглецеві наноматеріали, зокрема оксид графену (ОГр), який виявив антиоксидантну активність у терапії серцево-судинних, нейродегенеративних захворювань і хвороб скелетних м'язів. Отже, метою цієї роботи є з'ясування ролі ОГр як потенційного модифікатора поляризації клітин мікроглії лінії BV-2 за фенотипом M2.*

Методи. *Для дослідження були використані ОГр, отримані від компанії "Grafren AB" (Швеція). Як модель для визначення фенотипових і морфофункціональних особливостей за впливу ОГр використано мікрогліальні клітини миші лінії BV-2. Оцінювання цитотоксичних / мітогенних ефектів проводили при підрахунку співвідношення живих і мертвих клітин. Визначення лактатдегідрогеназної активності (ЛДГ) за впливу ОГр оцінювали спектрофотометричним методом за швидкістю окиснення NADH. Для визначення вмісту клітин, поляризованих за M1- та M2-фенотипом під впливом ОГр, використовували метод трьохпараметрової цитофлюориметрії із застосуванням моноклональних антитіл антимішиних CD80 FITC, антиаргінази 1 APC, антимішиних CD80 FITC, антимішиних iNOS PE.*

Результати. *При дослідженні цитотоксичного / цитостатичного впливу ОГр у концентрації 50 мкг/мл не зафіксовано змін у виживаності та проліферації клітин BV-2, що підтверджено сталістю ЛДГ-активності порівняно з контролем, і двократним зниженням показника відносно пероксиду водню. За результатами цитофлюориметричного аналізу підтверджено зростання субпопуляції M2 (CD80⁺Аргіназа-1⁺) позитивних клітин BV-2 під впливом оксиду графену порівняно з контролем.*

Висновки. *Збільшення субпопуляції M2 позитивних клітин BV-2 під впливом оксиду графену порівняно з контролем указують на його потенційну антиоксидантну та імуномодулюючу активність.*

Ключові слова: *оксид графену (ОГр), клітини мікроглії лінії BV-2, ЛДГ-активність, M1- та M2-поляризовані макрофаги.*

Вступ

Визначення ефективності терапії патологій головного мозку залежить від багатьох чинників, зокрема від клітин глії, які є структурними й морфофункціональними складниками гематоенцефалічного бар'єра. Активація клітин вродженого імунітету – мікроглії – супроводжує низку патологічних станів центральної нервової системи. Тканиноспецифічні макрофаги, роль яких у нервовій тканині виконують клітини мікроглії, традиційно поділяються на дві основні групи: класично активовані (M1) та альтернативно активовані (M2) макрофаги (Yang et al., 2021). Макрофаги M1, активовані ліпополісахаридом (LPS) з інтерфероном- γ (IFN- γ) або без нього, є прозапальними й експресують індуквану синтазу оксиду азоту (iNOS). Натомість макрофаги M2, активовані інтер-

лейкінами IL-4/IL-10, активніше беруть участь у проти-запальних процесах, загоєнні ран різної етіології та експресують аргіназу-1 (Arg1) (Quirino, 2013). У відповідь на різні подразники мікрогліальні клітини демонструють дві основні поляризації: класично активований M1-цитотоксичний фенотип і альтернативно активований M2-фенотип, якому притаманні протизапальна активація, поглинання активних форм кисню (АФК) та імунодепресивна дія (He et al., 2021; Jurga, Paleczna, & Kuter, 2020). У клітинній лінії мишачого походження BV-2 профіль антигенів, антимікробна та фагоцитарна активність майже аналогічні макрофагам організму (Lee et al., 2020). За умов оксидативного стресу клітини BV-2 здатні вивільняти прозапальні цитокини, тому їх використовують як альтернативну модельну систему в дослі-

дженнях нейродегенеративних захворювань, зокрема хвороби Альцгеймера та Паркінсона (Ненп, 2009). Актуальним є пошук природних чи синтетичних речовин, які здатні впливати на поляризацію мікроглії за фенотипом M1 (прозапальним) або M2 (антизапальним), як агентів, що здійснюють опосередковану дію на нейродегенеративні процеси (Rinaldi et al., 2024). Наномедицина відкриває нові можливості в галузі інновацій охорони здоров'я, використовуючи досягнення сучасної нанотехнології. Унікальне співвідношення поверхні до об'єму наноматеріалів робить їх ідеальними кандидатами для використання як лікарських засобів або їхніх носіїв на різних рівнях – у крові, тканинах, органах і клітинах. Поверхня є ключовим параметром наноматеріалів – її можна модифікувати для підвищення біосумісності, часу циркуляції в крові або селективності до цільової тканини. Попри відсутність належного регулювання в галузі нанотехнологій, сотні нанопрепаратів перебувають на стадії клінічних випробувань. Крім того, уже існує понад 80 комерційних продуктів, що охоплюють сфери фармацевтики, систем доставки лікарських засобів, медичної візуалізації та діагностики (Khakroug et al., 2023). Вуглецеві наноматеріали, зокрема оксид графену (ОГр), уже досліджувалися як антиоксиданти в терапії серцево-судинних і нейродегенеративних захворювань, хвороб скелетних м'язів і запальних розладів. Як антиоксидант графен виявляє значну активність у реакціях вловлення гідроксильних радикалів (ОН), помірну активність у розкладанні H_2O_2 і ліпідних пероксидальних радикалів, а також здатність нейтралізувати стійкі радикали, такі як DPPH і ABTS (Sencha-Hlevatska et al., 2024). Відомо, що антиоксидантна активність ОГр залежить від його електронної густини, хімічного складу та вмісту sp^2 -гібридизованого вуглецю. До поверхні графену завдяки полегшеній стеричній взаємодії з його π -орбітальми може приєднуватися велика кількість органічних молекул через ковалентні або нековалентні зв'язки (Voitko et al., 2022). Також установлено, що ОГр здатен імітувати дію антиоксидантних ферментів, зокрема каталази, супероксиддисмутази та глутатіонпероксидази (Войтко та ін., 2020). Хоча механізм дії ОГр ще остаточно не з'ясований, залежно від умов графен може нейтралізувати АФК шляхом донорства водню, перенесення електронів із поверхні або адсорбції. У попередніх дослідженнях було встановлено, що ОГр і його зразки, модифіковані азотом і сіркою, мають кардіопротекторні властивості в моделі ішемії / реперфузії *in situ* (Voitko et al., 2022). Отримані дані щодо антиоксидантного та кардіопротекторного ефекту ОГр можуть бути пов'язані з впливом на різні популяції клітин, зокрема тканинспецифічні макрофаги. Оскільки мікроглія відіграє важливу роль у розвитку нейродегенеративних захворювань, то **метою** цієї роботи є з'ясування ролі ОГр як потенційного модифікатора поляризації клітин мікроглії лінії BV-2 за фенотипом M2 з антиоксидантною активністю.

Методи

Для дослідження були використані ОГр, отримані від компанії "Grafen AB" (Швеція) у вигляді водорозчинної пасти темно-коричневого кольору (20–25 мас. %), яка була синтезована відповідно до стандарту ISO/TS 80004-13:2017 (E) "Графен та споріднені двовимірні 2D матеріали". Кількість шарів становила 10–15, розмір наночастинок – 0,1–200 нм, атомне співвідношення C/O поверхневих функціональних груп – 2,5–2,6. Розподіл частинок за розмірами визначали за допомогою методу ДРС (динамічне розсіювання світла) у тетра-

гідрофурані на лазерному фотонному кореляційному спектрометрі "Zetasizer-3" (Malvern Instrument, Великобританія). Спектри комбінаційного розсіювання (КР) реєстрували на спектрометрі T-64000 Horiba Jobin-Yvon в геометрії зворотного розсіювання за кімнатної температури при збудженні аргонним лазером ($k = 514,5$ нм, 1 мВ). Хімічний склад поверхні визначали із застосуванням інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є (ІЧ) і рентгенівської фотоелектронної спектроскопії (РФЕС). ІЧ-спектри записували за допомогою IR Tracer 100 (Shimadzu, Японія) з використанням алмазного кристала ATR. РФЕС-вимірювання проводили на електронному спектрометрі ESCALAB MkII (VG Scientific) з базовим тиском в аналітичній камері 5×10^{-10} бар (9×10^{-8} бар під час вимірювань), обладнаному подвійним анодом MgK α /AlK α та немонахромованим джерелом рентгенівського випромінювання з енергією збудження 1253,6 і 1486,6 еВ, відповідно.

У дослідженні впливу ОГр застосовували культивовані клітини мікроглії миші лінії BV-2, кат. № ABC-TC212S (AcceGen), люб'язно надані докторкою Головинською, які широко використовуються як альтернативна модельна система *in vitro* первинної мікроглії і визначення впливу на нейродегенеративні патології. Клітини культивували в стандартних умовах повного поживного середовища RPMI-1640 (Sigma, США) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (FBS, Sigma, США) при 37 °C, 5 % CO $_2$ та 100 % вологості в камері інкубації. Для визначення цитотоксичного / мітогенного впливу ОГр на клітини проводили інкубацію із цими наночастинками в концентрації 50 мкг/мл і визначення виживаності підрахунком співвідношення живих і мертвих клітин у камері Горяєва.

Визначення лактатдегідрогеназної активності (ЛДГ) за впливу ОГр оцінювали спектрофотометричним методом за швидкістю окиснення NADH під час відновлення пірвіноградної кислоти (піруват + NADH + H $^+$ \leftrightarrow L-лактат + NAD $^+$), як описано нами раніше (Orysuk et al., 2024). Зразки інкубували з піруватом та NADH, а потім вимірювали зменшення поглинання NADH при 340 нм. Вимірювали зменшення екстинкції (ΔE) на 1 мкмоль/хв. Результати представлені в нанокаталах (1 U дорівнює 16,67 нанокаталам). Для визначення прооксидантного впливу на клітини як негативний контроль використовували пероксид кисню в концентрації 3 мкМ.

Для визначення вмісту клітин, поляризованих за M1- та M2-фенотипом під впливом ОГр (концентрація 0,05 мкг/мл), використовували метод трьохпараметрової цитофлюориметрії із застосуванням моноклональних антитіл (МкАТ) антимишиних CD80, мічених FITC, антиаргіназу 1 APC антимишиних CD80, мічених FITC (клон A1exF5 у розведенні 1 : 1000), та антимишиних iNOS, мічених PE (клон CXNF1 у розведенні 1 : 1000) (Invitrogen, США). Вимірювання зразків проводили на проточному цитометрі FACS Calibur (Becton Dickinson, США) з аргонним лазером 488 нм і вузькосмуговим фільтром 582/642 нм для вимірювання флюоресценції PI. Аналіз даних проточної цитометрії виконували за допомогою спеціалізованих математичних програм CellQuest та ModFit LT 2.0 (BDIS, США).

Статистичне оброблення отриманих даних проводили із застосуванням програмного забезпечення Statistica 6.0 та Microsoft Excel. Для оцінювання достовірності виявлених змін застосовували t-критерій Стьюдента, достовірність значень приймали при $p < 0,05$. Отримані результати представлено у вигляді $M \pm m$ (середнє значення \pm стандартна похибка середнього).

Результати

При характеристиці наночастинок ОГр використовували методи візуалізації колоїдного розчину з концентрацією 50 мкг/мл (рис. 1). Як видно з рисунка, водний розчин містить нанопластинки ОГр розміром 1,5–5 μм, що нерівномірно розподіленні по об'єму. Згідно з даними ДРС (спектри не наведено) спостерігається вузький мономодальний розподіл частинок за діаметром із середнім значенням 1,5 μм завтовшки 3,783 нм. Спектри КР мають типові для такого матеріалу смуги – G- (1592 см⁻¹) та D-смуга (1358 см⁻¹). На частоті 1141 см⁻¹ спостерігається смуга, що відповідає sp³-гібридизації; на частоті 1758 см⁻¹ – D'-смуга, яка характерна для дефектного

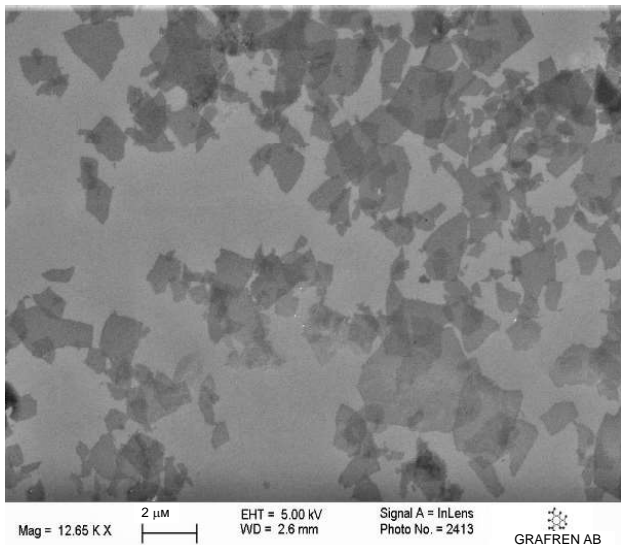


Рис. 1. Зображення наночастинок ОГр високої роздільної здатності за допомогою сканувального електронного мікроскопу (СЕМ)

Хімічний склад поверхні також визначали методом РФЕС (рис. 3). У досліджуваних зразках ОГр було встановлено, що атомне відношення С/О дорівнює 1,96 із внеском С ~ 65 %. Це важливий параметр, який характеризує високий ступінь окиснення. На окиснення зразків також указує спектр С 1s із високою роздільною здатністю (рис. 3а), який демонструє чітко визначені утворення подвійних піків. Пік sp²-гібридизованого карбону спостерігається при 284,6 еВ. Піки при 286,3, 286,6 і 288,6 еВ можуть бути пов'язані з різними конфігураціями СО-зв'язків через окиснення та руйнування атомної структури sp² графіту. Пік із високою інтенсивністю при 286,6 еВ належить до епоксидної групи (С-О-С), тоді як малі піки при 286,3 і 288,6 еВ характеризують гідроксильні / фенольні й карбоксильні групи (СООН або НО-С=О), відповідно. Максимум при 283,5 еВ можна віднести до зв'язку С-С у семикутниках, які є в дефектній структурі нанорозмірних вуглецевих матеріалів.

Екстремально високий рівень окиснення підтверджується також О 1s РФЕС-спектром (рис. 3б), що вказує на присутність груп С = О (пік при 530,9 еВ) та С-ОН (532,3 еВ). Особливістю ОГр також є наявність адсорбованого кисню на його поверхні, на що вказує пік при 533,9 еВ О 1s РФЕС-спектра.

Отже, отримані результати фізико-хімічної структури наночастинок ОГр указують на їхню потенційну активність щодо біосумісності з клітинами організму, у тому

багатошарового графену, до якого належить і ОГр. Детальний опис ДРС- та КР-спектрів наведено у (Voitko et al., 2022).

Різноманітність функціональних груп на поверхні ОГр було досліджено за допомогою ІЧ-спектроскопії (рис. 2). Найбільш характерні піки для ОГр спостерігаються при 3200 см⁻¹ (ОН-група у спиртах), 1720 см⁻¹ (С=О-група в карбонових кислотах і альдегідах), 1620 см⁻¹ (ароматичний С=C-зв'язок), 1370 см⁻¹ (ОН-група карбонових кислот), 1220 см⁻¹ (С-О-С-зв'язок в епоксидних групах), 1040 см⁻¹ (СО-О-СО-група). Смуга адсорбції при 2120 см⁻¹ відповідає обертонам слабкого зв'язку С-Н в ароматичних сполуках (Rattana, 2012).

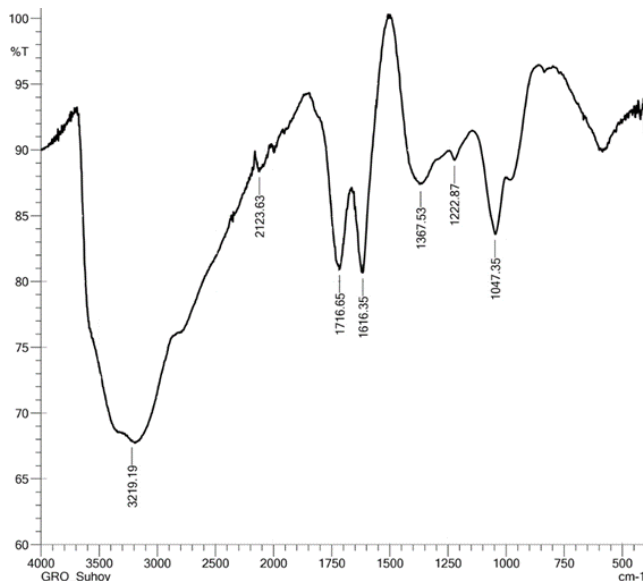


Рис. 2. Інфрачервоний (ІЧ) спектр функціональних груп пасти ОГр

числі здатністю модифікувати поляризацію фагоцитуючих клітин за про-/антизапальним фенотипом. У клітинах мікроглії як важливій ланці гематоенцефалічного бар'єра з вираженою активністю вродженого імунітету за впливу на них ОГр у концентрації 50 мкг/мл не виявлено токсичного ефекту (рис. 4) порівняно з контролем. Як негативний контроль використовували пероксид гідрогену 3 мкМ як прооксидантний чинник. Було виявлено його цитотоксичний ефект як порівняно з контролем, так і при дії ОГр. Також при додаванні до клітин ОГр, що були попередньо оброблені пероксидом гідрогену, було показано збільшення відсотка живих клітин порівняно з негативним контролем, що може вказувати на сорбцію ОГр активних форм кисню. При визначенні ЛДГ-активності в клітинах мікроглії було зафіксовано її 30 %-ве зниження порівняно з відповідним контролем. При обробленні клітин пероксидом гідрогену виявлено більш ніж двократне підвищення ЛДГ-активності порівняно з обробленням клітин ОГр і контролем (рис. 5). Такий ефект може бути пов'язаний із метаболічним перепрограмуванням клітин мікроглії, оскільки відомо, що поляризація типу М1 пов'язана з метаболічним перепрограмуванням у бік гліколізу, пентозофосфатного шляху та синтезу жирних кислот, тоді як поляризація типу М2 демонструє переважне метаболічне перемикання на окисне фосфорилування та окиснення жирних кислот (Liu et al., 2021).

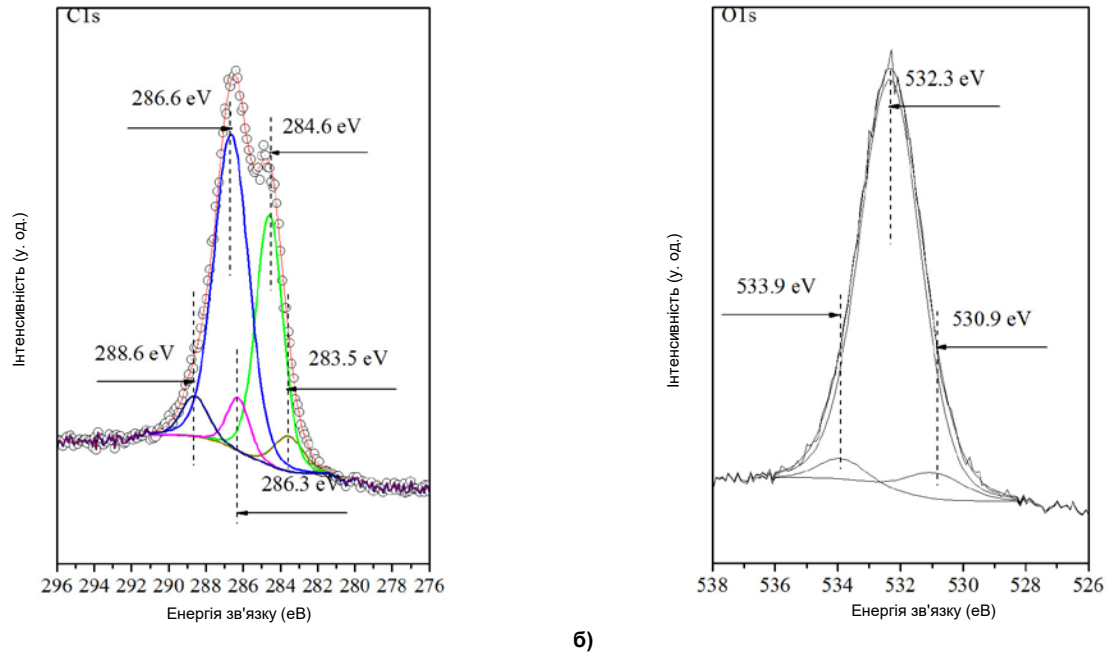


Рис. 3. Графік спектральної залежності C1s інтенсивності випромінювання (умовні одиниці) від енергії зв'язку (eV):
 а) – графік спектральної залежності O1s інтенсивності випромінювання (умовні одиниці) від енергії зв'язку (eV);
 б) – дані рентгенівської фотоелектронної спектроскопії

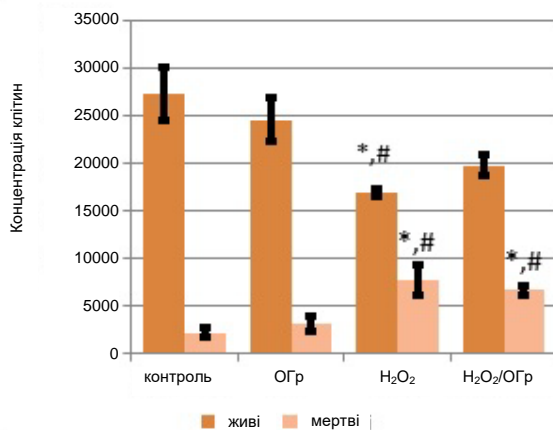


Рис. 4. Концентрація живих і мертвих клітин за дії оксиду графену (50 мкг/мл) порівняно з контролем (без оброблення клітин) і негативним контролем (оброблення пероксидом гідрогену)

Примітка. * – P < 0,05 проти контролю; # – P < 0,05 проти оброблення клітин OGr.

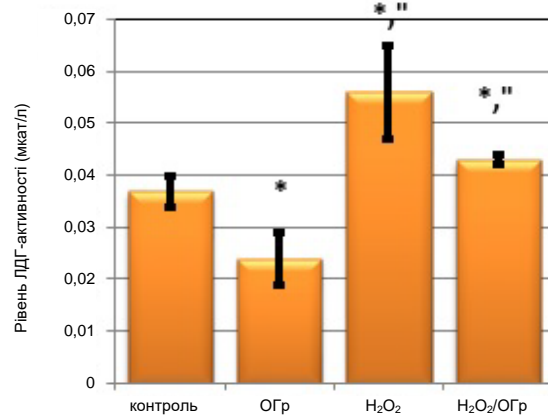


Рис. 5. Рівень ЛДГ-активності в клітинах за дії оксиду графену (50 мкг/мл) порівняно з контролем (без оброблення клітин) і негативним контролем (оброблення пероксидом гідрогену)

Примітка. * – P < 0,05 проти контролю; # – P < 0,05 проти оброблення клітин OGr.

Потенціал у перепрограмуванні культивованих клітин мікроглії за впливу OGr було підтверджено зростанням популяції CD80⁺/Аргіназа-1⁺ клітин до 5,56 % (рис. 6, а, б) проти 1,23 % у контролі (рис. 6 в, г), що свідчить про індукцію M2-поляризації. За морфологічними ознаками при обробленні клітин OGr зафіксовано збільшення розпластаних клітин та їх шиккування в певному напрямку.

Збільшення вмісту клітин мікроглії, поляризованих за M2-фенотипом (регенеративним) під впливом OGr, демонструє зменшення вмісту потенційно цитотоксичного M1, хоча на сьогодні існує наукова проблема щодо точного розрізнення специфічних фенотипів мікроглії та стану відповідних тканин щодо опосередкованого

впливу на мікроглію різних чинників природного й синтетичного походження (Jurga, Paleczna, & Kuter, 2020). На відміну від нейронів, клітини мікроглії здатні до відновлення, а метаболізм глюкози та її потрапляння в клітини мікроглії може бути як простою дифузією, характерною для нейронів, так і гліколізом і залученням через Glut5. Дослідження периферичних імунних клітин давно продемонстрували, що поляризація до фенотипу M1 часто супроводжується зміною виробництва енергії клітинами до аеробного гліколізу, тоді як M2 корелює з використанням мітохондріального окиснення (Fumagalli et al., 2018). Відомо, що прозапальні активовані M1 клітини мікроглії в системі *in vitro* збільшують поглинання глюкози й вироблення лактату з активацією пентозо-

фосфатного шляху та зниженням споживання кисню мітохондріями, що дозволяє швидким окиснювальним сплескам NO та супероксиду знищувати мішені (Rath, 2014). Отримані нами результати щодо зниження ЛДГ-активності під впливом ОГр порівняно з контролем опосередковано свідчать про зростання популяції M2 поляризованих макрофагів, що й підтверджено даними цитофлюориметричного аналізу зі специфічними анти-тілами. На сьогодні у зростаючому інтересі до клітин мікроглії як резидентних макрофагів нервової тканини

як фундаментальні дослідження, так і клінічна медицина потребують чітко описаних і валідованих молекулярних маркерів фенотипу мікроглії, які є важливими для діагностики, лікування та профілактики захворювань, що пов'язані з активацією глії. Отримані нами дані щодо впливу ОГр указують на його потенціал як антиоксидантного засобу та модулятора фенотипу мікроглії до протизапального M2-фенотипу й підтверджують його перспективність у терапії нейрозахвальних процесів як нейропротектора.

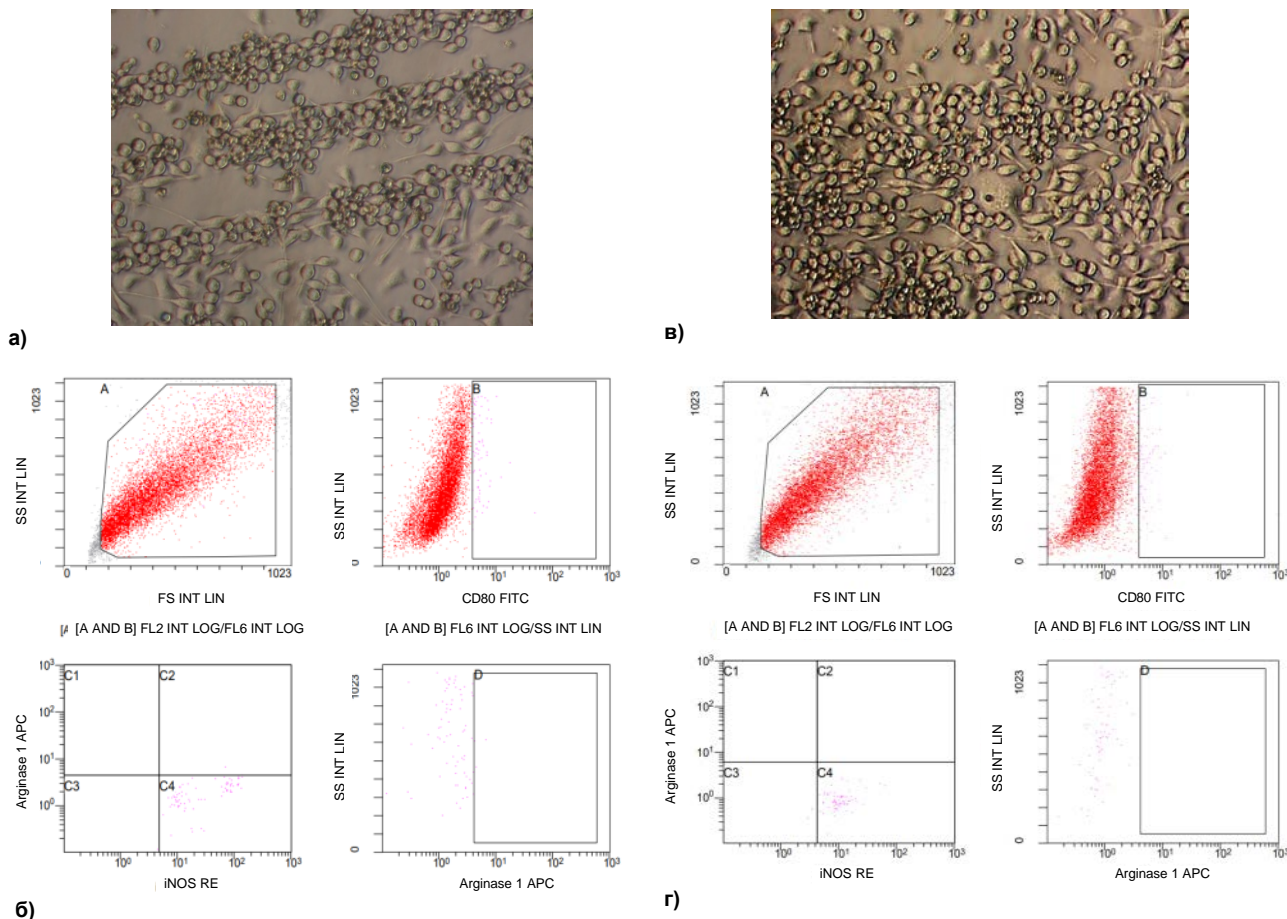


Рис. 6. Мікрофото (X100) і точкові графіки розподілу вмісту клітин мікроглії лінії BV-2 з поляризацією M1 (CD80 FITC, антимишиних iNOS PE)- та M2 (антимишиних CD80 FITC, антиаргіназа 1 APC)-фенотипів під впливом оксиду графену (концентрація 50 мкг/мл) (а, б) і в контролі (в, г)

Дискусія і висновки

Збільшення субпопуляції M2 позитивних клітин BV-2 під впливом оксиду графену порівняно з контролем указують на його потенційну антиоксидантну та імунотулюючу активність.

Внесок авторів: Іван Ступак – підготовка культивованих клітин мікроглії BV-2 до проведення аналізу на вплив ОГр, статистична обробка результатів; Людмила Остапченко – загальна концепція дослідження, літературний огляд; Людмила Гарманчук – визначення виживаності клітин мікроглії, оцінювання ЛДГ-активності, написання статті, аналіз результатів, Олександр Горбач – визначення розподілу вмісту клітин мікроглії лінії BV-2 з поляризацією M1 та M2 фенотипу; Катерина Сенча-Глевацька – характеристика оксиду графену фізичними та хімічними методами, написання статті.

Список використаних джерел

Войтко, К. В., Бакалінська, О. М., Гошовська, Ю. В., Семенов, Ю. І., & Картель, М. Т. (2020). Каталазоподібні властивості багаточарових оксидів

графену та їх модифікованих форм. *Поверхня*, 12(27), 251–258. <https://doi.org/10.15407/surface.2020.12.251>
 Fumagalli, M., Lombardi, M., Gressens, P., & Verderio, C. (2018). How to reprogram microglia toward beneficial functions. *Glia*, 66(12), 2531–2549. <https://doi.org/10.1002/glia.23484>
 He, L., Jhong, J. H., Chen, Q., Huang, K. Y., Strittmatter, K., Kreuzer, J., De Ran, M., Wu, X., Lee, T. Y., Slavov, N., Haas, W., & Marneros, A. G. (2021). Global characterization of macrophage polarization mechanisms and identification of M2-type polarization inhibitors. *Cell Reports*, 37(5), 109955. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109955>
 Henn, A. (2009). The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX – Alternatives to animal experimentation*, 26(2), 83–94. <https://doi.org/10.14573/altex.2009.2.83>
 Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 198. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>
 Khakpour, E., Salehi, S., Naghib, S. M., Ghorbanzadeh, S., & Zhang, W. (2023). Graphene-based nanomaterials for stimuli-sensitive controlled delivery of therapeutic molecules. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1129768. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1129768>
 Lee, H. J., Seo, M., Baek, M., Shin, Y. P., Lee, J. H., Kim, I. W., Hwang, J. S., & Kim, M. (2020). Inhibitory effect of protaetiamycine 6 on neuroinflammation in LPS-stimulated BV-2 microglia. *Journal of Life Science*, 30(12), 1078–1084.

- Liu, Y., Xu, R., Gu, H., Zhang, E., Qu, J., Cao, W., Huang, X., Yan, H., He, J., & Cai, Z. (2021). Metabolic reprogramming in macrophage responses. *Biomarker Research*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00251-y>
- Orysyk, V., Garmanchuk, L., Orysyk, S., Zborovskii, Yu., Shishkina, S., Stupak, I., Novikova, P., Ostapchenko, D., Khranovska, N., Pekhnyo, V., & Vovk, M. (2024). Iodide n,π-chelate complexes of platinum(II) based on N-allyl substituted thioureas and their effect on the activity of hepatobiliary system enzymes in comparison with chloride analogs. *Ukrainian Biochemical Journal*, 96(3), 58–79. <https://doi.org/10.15407/ubj96.03.075>
- Quirino, I. E. P., Cardoso, V. N., Dos Santos, R. D. G. C., Evangelista, W. P., Arantes, R. M. E., & Fiúza, J. A. (2013). The role of L-arginine and inducible nitric oxide synthase in intestinal permeability and bacterial translocation. *JPEN: Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 37(3), 392–400. <https://doi.org/10.1177/0148607112458325>
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., & Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*, 5, 532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
- Rattana, S., Chaiyakun, N., Witit-anun, N., Nuntawong, P., Chindaodom, S., Oaew, C., Kedkeaw, P., & Limsuwan. (2012). Preparation and characterization of graphene oxide nanosheets. *Procedia Engineering*, 32, 759–764. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.02.009>
- Rinaldi, A., Ballelli, M., Principi, E., De Luca, M., De Felice, E., Narcisi, F. M., Vilardo, L., Rosito, M., Piantentini, R., D'Alessandro, G., D' Agnano, I., Maggi, L., Conti, F., Limatola, C., & Catalano, M. (2024). BV2-derived extracellular vesicles modulate microglia inflammatory profile, neuronal plasticity, and behavioural performances in late adult mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 122, 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2024.08.012>
- Sencha-Hlevatska, K. V., Sementsov, Y. I., & Zhuravskiy, S. V. (2024). A multifactorial study of in situ antioxidant activity of modified GrO in myocardial reperfusion injury using the Langendorff model. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 753, 109885. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.109885>
- Voitko, K. V., Goshovska, Y. V., Demianenko, E. M., Sementsov, Y. I., Zhuravskiy, S. V., Mys, L. A., Korkach, Y. P., Kolev, H., & Sagach, V. F. (2022). Graphene oxide nanoflakes prevent reperfusion injury of Langendorff isolated rat heart providing antioxidative activity in situ. *Free Radical Research*, 56(3–4). <https://doi.org/10.1080/10715762.2022.2096450>
- Yang, S., Qin, C., Hu, Z.-W., Zhou, L.-Q., Yu, H.-H., Chen, M., Bosco, D. B., Wang, W., Wu, L.-J., & Tian, D.-S. (2021). Microglia reprogram metabolic profiles for phenotype and function changes in central nervous system. *Neurobiology of Disease*, 152, 105290. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105290>
- Khakpour, E., Salehi, S., Naghib, S. M., Ghorbanzadeh, S., & Zhang, W. (2023). Graphene-based nanomaterials for stimuli-sensitive controlled delivery of therapeutic molecules. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1129768. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1129768>
- Lee, H. J., Seo, M., Baek, M., Shin, Y. P., Lee, J. H., Kim, I. W., Hwang, J. S., & Kim, M. (2020). Inhibitory effect of protaetiamycine 6 on neuroinflammation in LPS-stimulated BV-2 microglia. *Journal of Life Science*, 30(12), 1078–1084.
- Liu, Y., Xu, R., Gu, H., Zhang, E., Qu, J., Cao, W., Huang, X., Yan, H., He, J., & Cai, Z. (2021). Metabolic reprogramming in macrophage responses. *Biomarker Research*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00251-y>
- Orysyk, V., Garmanchuk, L., Orysyk, S., Zborovskii, Yu., Shishkina, S., Stupak, I., Novikova, P., Ostapchenko, D., Khranovska, N., Pekhnyo, V., & Vovk, M. (2024). Iodide n,π-chelate complexes of platinum(II) based on N-allyl substituted thioureas and their effect on the activity of hepatobiliary system enzymes in comparison with chloride analogs. *Ukrainian Biochemical Journal*, 96(3), 58–79. <https://doi.org/10.15407/ubj96.03.075>
- Quirino, I. E. P., Cardoso, V. N., Dos Santos, R. D. G. C., Evangelista, W. P., Arantes, R. M. E., & Fiúza, J. A. (2013). The role of L-arginine and inducible nitric oxide synthase in intestinal permeability and bacterial translocation. *JPEN: Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 37(3), 392–400. <https://doi.org/10.1177/0148607112458325>
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., & Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*, 5, 532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
- Rattana, S., Chaiyakun, N., Witit-anun, N., Nuntawong, P., Chindaodom, S., Oaew, C., Kedkeaw, P., & Limsuwan. (2012). Preparation and characterization of graphene oxide nanosheets. *Procedia Engineering*, 32, 759–764. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.02.009>
- Rinaldi, A., Ballelli, M., Principi, E., De Luca, M., De Felice, E., Narcisi, F. M., Vilardo, L., Rosito, M., Piantentini, R., D'Alessandro, G., D' Agnano, I., Maggi, L., Conti, F., Limatola, C., & Catalano, M. (2024). BV2-derived extracellular vesicles modulate microglia inflammatory profile, neuronal plasticity, and behavioural performances in late adult mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 122, 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2024.08.012>
- Sencha-Hlevatska, K. V., Sementsov, Y. I., & Zhuravskiy, S. V. (2024). A multifactorial study of in situ antioxidant activity of modified GrO in myocardial reperfusion injury using the Langendorff model. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 753, 109885. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2024.109885>
- Voitko, K. V., Bakalinska, O. M., Goshovska, Y. V., Sementsov, Y. I., & Kartel, M. T. (2020). Catalase-like properties of multilayer graphene oxides and their modified forms. *Surface*, 12(27), 251–258 [in Ukrainian]. <https://doi.org/10.15407/surface.2020.12.251>
- Voitko, K. V., Goshovska, Y. V., Demianenko, E. M., Sementsov, Y. I., Zhuravskiy, S. V., Mys, L. A., Korkach, Y. P., Kolev, H., & Sagach, V. F. (2022). Graphene oxide nanoflakes prevent reperfusion injury of Langendorff isolated rat heart providing antioxidative activity in situ. *Free Radical Research*, 56(3–4). <https://doi.org/10.1080/10715762.2022.2096450>
- Yang, S., Qin, C., Hu, Z.-W., Zhou, L.-Q., Yu, H.-H., Chen, M., Bosco, D. B., Wang, W., Wu, L.-J., & Tian, D.-S. (2021). Microglia reprogram metabolic profiles for phenotype and function changes in central nervous system. *Neurobiology of Disease*, 152, 105290. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105290>

References

- Fumagalli, M., Lombardi, M., Gressens, P., & Verderio, C. (2018). How to reprogram microglia toward beneficial functions. *Glia*, 66(12), 2531–2549. <https://doi.org/10.1002/glia.23484>
- He, L., Jhong, J. H., Chen, Q., Huang, K. Y., Strittmatter, K., Kreuzer, J., De Ran, M., Wu, X., Lee, T. Y., Slavov, N., Haas, W., & Marneros, A. G. (2021). Global characterization of macrophage polarization mechanisms and identification of M2-type polarization inhibitors. *Cell Reports*, 37(5), 109955. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109955>
- Henn, A. (2009) The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. *ALTEX – Alternatives to animal experimentation*, 26(2), 83–94. <https://doi.org/10.14573/altex.2009.2.83>
- Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of general and discriminating markers of differential microglia phenotypes. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 198. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>

Отримано редакцією журналу / Received: 15.06.25
Прорецензовано / Revised: 12.07.25
Схвалено до друку / Accepted: 28.08.25

Ivan STUPAK¹, PhD Student
ORCID ID: 0000-0003-1035-1659
e-mail: ivan.stupak@knu.ua

Liudmyla OSTAPCHENKO¹, DSc (Biol.)
ORCID ID: 0000-0001-7181-6048
e-mail: ostapchenko@knu.ua

Liudmyla GARMANCHUK¹, DSc (Biol.)
ORCID ID: 0000-0002-1527-2346
e-mail: liudmylagarmanchuk@knu.ua

Oleksandr HORBACH², PhD (Biol.)
ORCID ID: 0000-0003-2922-6049
e-mail: horbach.alex@gmail.com

Kateryna SENCHA-HLEVATSKA³, PhD (Chem.)
ORCID ID: 0000-0003-4850-944X
e-mail: ksencha.h@gmail.com

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

² National Cancer Institute, Kyiv, Ukraine

³ O. O. Chuiko Institute of Surface Chemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF GRAPHENE OXIDE ON THE FUNCTIONAL AND PHENOTYPICAL PROPERTIES OF BV-2 MICROGLIAL CELLS

Background. Determining the effectiveness of therapy for brain pathologies depends on many factors, in particular on glial cells, which are structural and morphofunctional components of the blood-brain barrier and can be involved in a number of pathological conditions of the central nervous system. In the mouse-derived BV-2 cell line, the antigen profile, antimicrobial and phagocytic activity are almost similar to macrophages of the body and therefore they are used as an alternative model system in studies of neurodegenerative diseases. Potential drugs or their carriers at different levels of impact on biological objects are carbon nanomaterials, in particular graphene oxide (GO), which has shown antioxidant activity in the therapy of cardiovascular, neurodegenerative and skeletal muscle diseases. Therefore, the aim of this work is to clarify the role of GO as a potential modifier of polarization of BV-2 microglial cells according to the M2 phenotype.

Methods. For the study, OGr obtained from the company "Grafren AB" (Sweden) were used. As a model for determining the phenotypic and morphofunctional features under the influence of OGr, microglial cells of the BV-2 mouse line were used. The assessment of cytotoxic/mitogenic effects was carried out by calculating the ratio of live and dead cells. Determination of lactate dehydrogenase activity (LDH) under the influence of OGr was estimated by the spectrophotometric method according to the rate of NADH oxidation. To determine the content of cells polarized by the M1 and M2 phenotype under the influence of OGr, the method of 3-parameter cytofluorimetry using monoclonal antibodies anti-mouse CD80 FITC, anti-arginase 1 APC, anti-mouse CD80 FITC, anti-mouse iNOS PE was used.

Results. When studying the cytotoxic/cytostatic effect of OGr at a concentration of 50 µg/ml, no changes were recorded in the survival and proliferation of BV-2 cells, which was confirmed by the constancy of LDH activity compared to the control, and a 2-fold decrease in the indicator relative to hydrogen peroxide. The results of cytofluorimetric analysis confirmed the increase in the M2 subpopulation (CD80⁺/Arginase-1⁺) of positive BV-2 cells under the influence of graphene oxide compared to the control.

Conclusions. The increase in the M2 subpopulation of positive BV-2 cells under the influence of graphene oxide compared to the control indicates its potential antioxidant and immunomodulatory activity.

Keywords: Graphene oxide (OGr), BV-2 microglia cells, LDH activity, M1 and M2 polarized macrophages.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.