

# Biozgodność tlenku grafenu na modelu ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych

Stepińska M.<sup>1</sup>, Dobrzyńska M.<sup>1</sup>, Lewandowski R.<sup>1</sup>, Lipińska L.<sup>2</sup>, Woluntarski M.<sup>2</sup>, Łapiński M.<sup>1</sup>, Trafny E.A.<sup>1</sup>

Centrum Inżynierii Biomedycznej, Instytut Optoelektroniki WAT<sup>1</sup>, Instytut Technologii Materiałów Elektronicznych<sup>2</sup>  
e-mail: malgorzata.stepinska@wat.edu.pl

## Wstęp

Grafen, dwu-wymiarowa forma węgla o grubości jednego atomu tego pierwiastka, nowoczesny produkt nanotechnologii, mający wyjątkowe właściwości czyniące z niego obiecujący materiał do zastosowań między innymi w inżynierii biomedycznej. W celu potwierdzenia, że grafen jest bezpieczny dla zdrowia człowieka niezbędne jest sprawdzenie biozgodności tego materiału w różnych układach biologicznych. Przeprowadzone badania *in vitro* na modelu komórek eukariotycznych miały na celu ocenę toksyczności badanego tlenku grafenu (GO) na hodowle ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMSC).

## Materiały i metody

### Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste

Materiał komórkowy stanowiły ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące od zdrowego dawcy z trzeciego pasażu (hMSC, LONZA PT-2501). Studzienki 12-dółkowych polistyrenowych mikroplitek (Grainer) zaszczepiano 2 ml zawiesiny komórek o gęstości  $5,0 \times 10^5$ /ml w medium MSCG hMSC Bullet Kit (LONZA, PT-3001). Hodowlę komórek hMSC prowadzono przez 5 dni w inkubatorze do hodowli komórkowej (INCOmed 153, Memmert) w 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> i wilgotności 80% do uzyskania 80-90% konfluencji.

### Grafen

Badany nanomateriał stanowiły dwie postaci tlenku grafenu GO, wytwarzanego w Instytucie Technologii Materiałów Elektronicznych w Warszawie. Pierwsza postać F (GO FOXTROT II, płatki o średnicy 7-20 μm) oraz druga postać E (GO ECHO 3B, płatki o średnicy 1-10 μm) zostały doprowadzone w medium hodowlanym do równego wyjściowego stężenia wynoszącego 1,25 mg/ml (NR) oraz rozcieńczone 100-krotnie. Zawiesiny grafenu w objętości 2 ml/dółek mikroplitek dodawano do konfluentnych hodowli hMSC i inkubowano w ciągu 24 godzin w warunkach jak opisano poprzednio.



### Badanie morfologii komórek

Morfologię komórek hMSC w hodowli obserwowano po wymianie medium hodowlanego przy powiększeniu 1000-krotnym w diagnostycznym mikroskopie odwróconym (MW100, OPTA-TECH). Zdjęcia wykonano przy użyciu kamery cyfrowej 5 MP i oprogramowania Opta-view-IS (OPTA-TECH).

### Badanie toksyczności GO w hodowli komórek hMSC

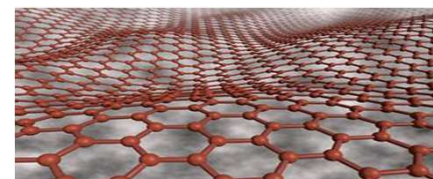
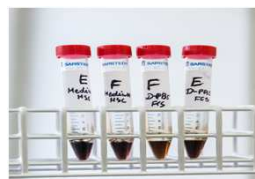
Komórki hMSC po 24 godzinnej inkubacji z zawiesinami GO w medium odklejano przy pomocy enzymu akutazy (StemPro<sup>®</sup> Accutase<sup>®</sup>, Gibco). Po odwirowaniu zawiesiny komórek (5 minut, 143 RCF, temp. 20°C) określano liczbę komórek hMSC w próbce badanej, po wybarwieniu za pomocą jodku propidyny (Zestaw TALI VIABILITY KIT-DEAD CELL R, oraz TALI APOPTOSIS KIT-ANNEXIN V, Molecular Probes) oraz przeprowadzono test na apoptozę (Zestaw Tali APOPTOSIS KIT-ANNEXIN V, Molecular Probes) w aparacie mini cytometr Tali (Invitrogen) zgodnie z procedurą producenta.



## Wyniki

### Właściwości fizyczno-chemiczne tlenku grafenu

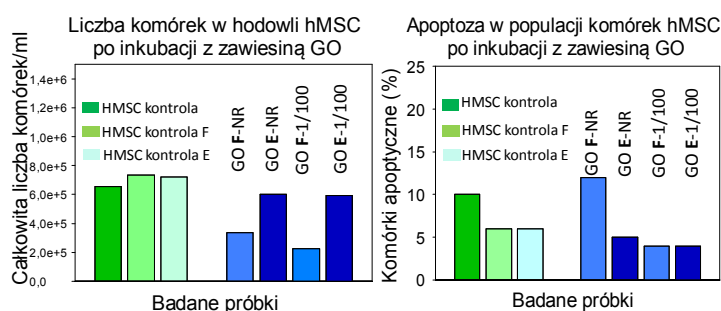
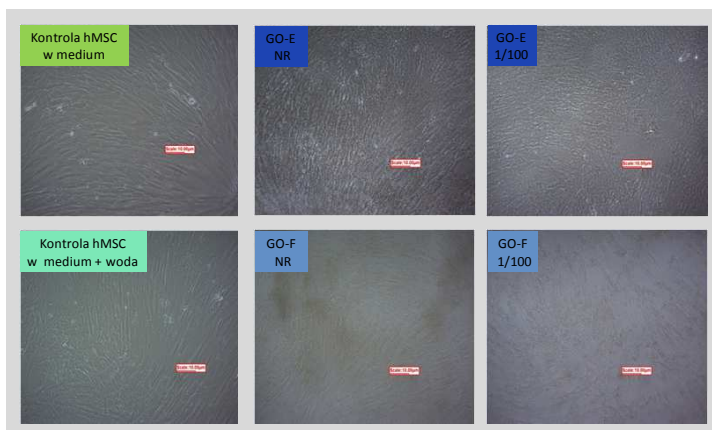
Badany tlenek grafenu niezależnie od wielkości cząstek w odmianie GO-F (GO FOXTROT II) oraz GO-E (GO ECHO 3B), tworzył w roztworach wodnych takich jak medium komórkowe (MSCG hMSC Bullet Kit, LONZA) oraz bufor D-PBS (Gibco) z dodatkiem 2% surowicy cielęcej płodowej (Gibco) postać stabilnego koloidu.



### Oddziaływanie GO z komórkami hMSC w hodowli *in vitro*

#### Morfologia komórek w obrazie mikroskopowym

Po 24 godzinnej inkubacji komórek hMSC z zawiesinami GO obserwowano zmianę wielkości i kształtu komórek w hodowli w porównaniu do hodowli kontrolnej.



### Toksyczność GO w hodowli komórek hMSC

Całkowita liczba komórek uzyskana po odklejeniu komórek hMSC od podłoża w badanych próbkach dla preparatu GO ECHO 3B, oraz GO FOXTROT II nie wykazała istotnie-znamiennych różnic w stosunku do hodowli kontrolnych, jednakże w przypadku materiału GO FOXTROT II (odpowiednio GO F-NR i GO F1/100) obserwowano 2 i 3-krotne obniżenie liczby komórek hMSC w stosunku do próbek z hodowli kontrolnych. Test na apoptozę nie wykazał istotnych różnic w hodowlach hMSC inkubowanych z zawiesinami GO w porównaniu do komórek hMSC hodowanych w czystym medium lub medium z dodatkiem wody odpowiednim dla danej zawiesiny GO (hMSC kontrola F i hMSC kontrola E). W większości próbek badanych dla hodowli komórek hMSC obserwowano zjawisko apoptozy na poziomie poniżej 10% a więc nie przekraczającym wartości dla próbek kontrolnych, za wyjątkiem nierozcieńczonej zawiesiny GO FOXTROT II (apoptoza 12%). Komórki hMSC w hodowli *in vitro* wykazywały lepszą tolerancję na preparat GO ECHO 3B.

## Wnioski

Tlenek grafenu w zależności od swojej postaci chemiczno-fizycznej może różnie oddziaływać z komórkami eukariotycznymi *in vitro*.

W celu wyjaśnienia biologicznych mechanizmów oddziaływania grafenu istnieje potrzeba dalszych pogłębionych badań *in vitro* na różnego rodzaju modelach komórek ludzkich.