



УДК 544.785;576.38;615.9

© 2009

Член-корреспондент НАН України **Н. Т. Картель**, академик НАН України **В. И. Грищенко**, член-корреспондент НАН України **В. П. Черных**, **Л. В. Иванов**, **О. А. Нардид**, **Ю. И. Семенцов**, **Г. П. Приходько**, **С. Н. Коваленко**, **Ю. И. Губин**, **С. В. Репина**

Использование метода спиновых зондов для оценки цитотоксичности углеродных нанотрубок

Для вивчення механізмів цитотоксичності вуглецевих нанотрубок (ВНТ) застосовано модифікації методу спинових зондів. Показано, що пошкодження мембран еритроцитів під дією ВНТ розвивається у часі, зокрема, при введенні суспензії ВНТ (200 мкг/мл) через 2 доби експозиції зразків (6 °С) кількість пошкоджених еритроцитів становила 25%. Експозиція гомогенату печінки з ВНТ протягом 4 год при 0 °С призводить до значного зниження мітохондріальної активності (інгібуванню ланцюга передачі електронів у мітохондріях). Отримані дані показують, що цитотоксичність, обумовлена дією ВНТ, пов'язана не тільки зі зміною мембранних структур клітин, а й з впливом на їхні функціональні властивості.

Со времени открытия углеродных нанотрубок (УНТ) в 1991 г. С. Иидзимой [1] (фактически повторно за Л.В. Радущкевичем, В.М. Лукьяновичем, 1952) вопрос об их токсичности остается одним из ключевых. В связи с этим с 2001 г. начаты систематические и масштабные исследования токсичности и биосовместимости УНТ, различающихся происхождением, структурой и чистотой, с различными биологическими объектами в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [2–6]. Полученные к настоящему времени данные не дают четкой картины об уровне безвредности и безопасности таких наноматериалов для живого организма.

В частности, до сих пор неясен вклад в токсичность нанотрубок механического повреждения ими мембран клеток, а также более тонкого эффекта влияния УНТ на биохимические процессы в субклеточных органеллах — митохондриях и ядре. Если факт влияния нанотрубок на ДНК и ядро клеток не раз экспериментально доказан [7, 8], то в отношении митохондрий, находящихся внутри клеток, данных о влиянии УНТ на их активность в настоящее время нет.

Для изучения механизмов токсичности УНТ на молекулярном и мембранном уровнях нами предложен метод спиновых зондов, который успешно используется в молекулярной

биологии и фармакологии [9]. Этот метод позволяет изучать непрозрачные растворы и вязкие взвеси биообъектов, суспензии клеток, образцы биологических тканей кожи, печени, почки, мышечной и нервной ткани.

В настоящем сообщении описаны с помощью спиновых зондов механизмы цитотоксичности углеродных нанотрубок. Для этого прослеживали целостность мембран эритроцитов крови человека и митохондриальную активность гомогената печени крыс в присутствии суспензий УНТ. Исследовано непосредственное взаимодействие (образование супрамолекулярных комплексов) УНТ с гидрофильным и липофильным зондами, рассматриваемых в качестве парамагнитных моделей лекарственных веществ.

В работе использовали высокочистые многостенные УНТ, полученные на пилотной установке, разработанной Институтом химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины и ООО “ТМСпецмаш” (Киев), путем каталитического пиролиза непредельных углеводородов [10]. Внутренний диаметр нанотрубок равен 1–2 нм, внешний 10–40 нм, зольность — менее 0,4%, содержание нанотрубок — более 95%.

Эритроциты крови человека получали из эритромаксы, отмытой от плазмы и стабилизирующего раствора центрифугированием в физиологическом растворе (рН 7,2). Гомогенат печени крыс готовили по методике [11].

В качестве парамагнитных зондов использовали водорастворимый иминоксильный радикал: 2,2,6,6-тетраметил-4-оксо-пиперидин-1-оксил (**1**) и липофильный иминоксильный радикал 2,2,6,6-тетраметил-4-оксо-пиперидин-1-цианурхлорид (**2**).

Для получения стабильной суспензии УНТ ее обрабатывали ультразвуком, замораживали и после размораживания центрифугировали при скорости 10000 об/мин. В экспериментах использовали надосадочную жидкость. В каждом опыте готовили два образца суспензии эритроцитов по 0,9 мл. Один образец (контроль для учета старения клеток при экспозиции) выдерживали в течение необходимого времени экспозиции и необходимой температуры без УНТ, а другой (опытный) — в контакте с суспензией УНТ. Через различное время выдержки к образцам добавляли по 0,1 мл стандартного раствора спинового зонда и уширителя (феррицианида калия), а затем регистрировали спектры ЭПР с помощью радиоспектрометра (Bruker ER 100 D, Германия). Аналогичный опыт проводили со взвесью гепатоцитов. Контакт эритроцитов с УНТ осуществляли в течение 2 сут при 6 °С, а гомогената печени — в течение 4 ч при 0 °С.

Ранее для изучения целостности изолированных клеток и клеток образцов тканей был предложен количественный экспресс-метод, в котором в суспензию клеток вводят парамагнитный зонд (**1**), быстро проникающий внутрь клеток. Далее вводят уширитель спектров ЭПР — феррицианид калия, который в норме не проникает внутрь клеток, зато уширяет до нуля линии сверхтонкой структуры спектра ЭПР зонда, находящегося во внеклеточной среде [12]. Интенсивность спектра ЭПР от зонда, находящегося внутри клеток, пропорциональна количеству целых клеток в суспензии. Ошибка метода в определении неповрежденных клеток не превышает 3%. Этот способ можно реализовать в ином плане: вначале получить раствор зонда с уширителем (нулевая линия), добавить взвесь клеток, получив спектр ЭПР (триплет) от зондов, проникших внутрь клеток, затем изучить целостность клеток. Появление триплета в этом случае показывает, что внутриклеточная среда недоступна для уширителя.

В работе авторов настоящего сообщения был использован данный способ для оценки влияния УНТ на целостность мембран эритроцитов. При этом мы приняли к сведению результаты многочисленных исследований [2–6], в которых порог токсических эффектов,

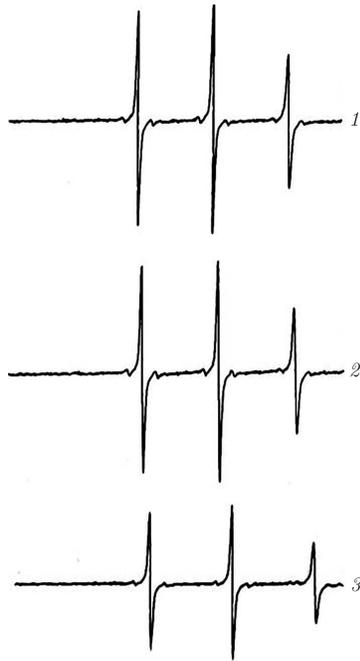


Рис. 1. Спектры ЭПР спинового зонда в цитозоле эритроцитов донорской крови после инкубации 2 сут при 6 °С с УНТ различной концентрации: 1 — контроль; 2 — 10 мкг/мл; 3 — 200 мкг/мл

вызываемых суспензиями УНТ, может наблюдаться при концентрации порядка 10 мкг/мл для клеток.

Нами было показано, что добавление суспензий УНТ с концентрациями 10, 50, 100 и 200 мкг/мл к суспензии эритроцитов после десятиминутной экспозиции не приводило к каким-либо изменениям в спектрах ЭПР, что свидетельствовало о сохранении целостности эритроцитов во всех опытах. Лишь после 45 мин в опыте, где использовалась суспензия УНТ в концентрации 200 мкг/мл, интенсивность сигнала ЭПР снизилась на 12–15%, что свидетельствовало о появлении нарушений мембран у значительной части эритроцитов. Через 2 сут количество поврежденных эритроцитов достигало более 25% (рис. 1). Это свидетельствует о том, что эффект повреждения мембран эритроцитов под действием УНТ является процессом, развивающимся во времени. Полученный результат согласуется с выводами работ [2–6]: процесс разрушения различных клеток получает свое развитие в период от нескольких часов до нескольких суток. Оказалось, что и меньшие концентрации УНТ оказывают повреждающее действие на эритроциты. Так, через 2 сут суспензии УНТ с концентрациями 10, 50 и 100 мкг/мл разрушили соответственно 4, 10 и 16% эритроцитов (рис. 2).

Таким образом, процесс нарушения целостности мембран эритроцитов имеет пороговый характер и начинается при концентрации УНТ порядка 10 мкг/мл, но для реализации этого эффекта требуется достаточно длительное время контакта.

Мы предположили, что затяжной характер эффекта разрушения эритроцитов может быть объяснен рядом факторов. Это, прежде всего, большие размеры нанотрубок и поверхность контакта между мембранами клеток и нанотрубками, а также их липофильность. Последняя из-за гидрофильности поверхности мембран, имеющих полярные головки фосфолипидов и гликокаликс (полисахариды со связанной водой), мешает нанотрубкам

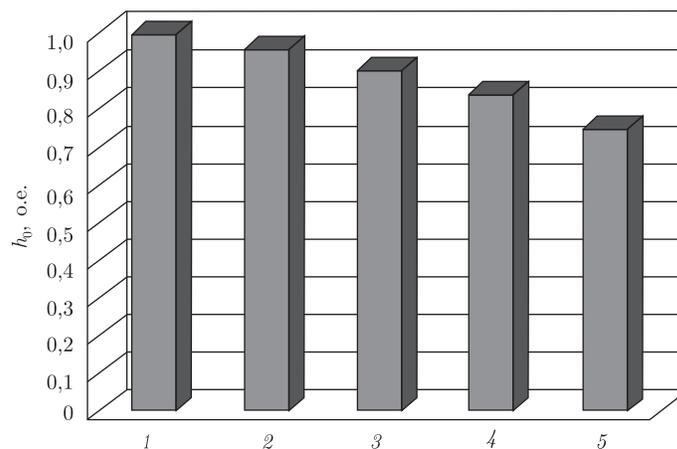


Рис. 2. Влияние инкубации эритроцитов донорской крови с УНТ различной концентрации на интенсивность центрального компонента спектра ЭПР парамагнитного зонда (**1**): 1 — контроль; 2 — 10 мкг/мл; 3 — 50 мкг/мл; 4 — 100 мкг/мл; 5 — 200 мкг/мл

быстро погрузиться в липидный бислой мембраны и осуществить трансмембранную диффузию внутрь клеток.

Современные бифокальные и просвечивающие микроскопы не позволяют непосредственно наблюдать повреждения и разрывы в мембранах порядка 0,5–1,0 нм, по-видимому, тогда как метод спиновых зондов быстро и адекватно фиксирует появление дефектов клеточных мембран независимо от непрозрачности изучаемых образцов.

Следует, по-видимому, учитывать и способность УНТ проявлять полупроводниковые и металлические свойства в зависимости от строения и внешних условий [13]. Поэтому мы предположили, что нанотрубки могут существенно повлиять на биохимические процессы, протекающие в митохондриях, нейронах, кардиомиоцитах и связанные с переносом зарядов. В связи с этим мы использовали модификацию метода спиновых зондов, в котором по скорости восстановления водорастворимого зонда (**1**), введенного в суспензию клеток, имеющих митохондрии (гепатоциты), можно судить об активности цепи переноса электронов (дыхательная цепь митохондрий), не разрушая клетки гепатоцитов [14]. Восстановление зонда (**1**) до непарамагнитного гидроксилamina осуществляется сильным антиоксидантом — коэнзимом Q_{10} дыхательной цепи митохондрий. При этом интенсивность спектра ЭПР экспоненциально снижается во времени. Логарифмируя такие кривые, получаем прямые, тангенс угла наклона которых к оси абсцисс пропорционален скорости восстановления зонда и, следовательно, митохондриальной активности клеток гепатоцитов.

На рис. 3 представлены данные о влиянии суспензии УНТ с концентрацией 200 мкг/мл на скорость восстановления спинового зонда (**1**) в суспензии гепатоцитов (митохондриальная активность). Скорость восстановления зонда оценивали по скорости падения интенсивности линий спектра ЭПР зонда, находящегося в суспензии гепатоцитов. Из рисунка видно, что присутствие УНТ в суспензии гепатоцитов после четырехчасовой экспозиции приводит к ингибированию цепи переноса электронов в митохондриях в несколько раз (т. е. к существенному снижению митохондриальной активности клеток). Следовательно, для гепатоцитов механизм токсичности нанотрубок состоит не только в преодолении и разрушении цитоплазматической мембраны, но и в последующем за этим ингибировании дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов.

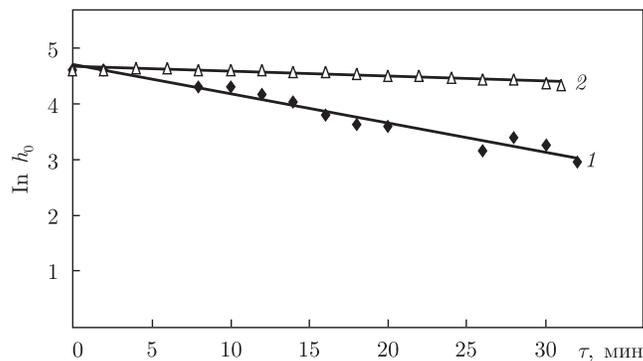


Рис. 3. Восстановление спинового зонда в гомогенате печени после четырехчасовой инкубации: 1 — контроль; 2 — с 200 мкг/мл УНТ

Предложенный метод исследования цитотоксичности УНТ является уникальной возможностью получать важнейшую информацию в отношении активности митохондрий без разрушения клеток, а также в отношении влияния проводящих нанотрубок на электрохимические процессы внутри клетки. Возможно, в механизме ингибирования лежат механические повреждения митохондрий как субклеточных структур, а, взаимодействие проводящих нанотрубок с митохондриями (параллельное соединение проводников) приводит к частичному перераспределению и утечке электронов дыхательной цепи на нанотрубки, что приводит к уменьшению потока электронов в митохондриях и снижению скорости восстановления нитроксильного радикала (зонда). Нельзя также исключить и то, что нанотрубки могут обусловить повреждение митохондрий посредством генерации активных форм кислорода [7], либо образованием газовых кислородных электродов и микрогальванических пар, приводящих к электрохимическому повреждению (своеобразной “коррозии”) митохондрий.

Нами изучено также взаимодействие УНТ со спиновыми зондами (1) и (2) как парамагнитных моделей лекарственных веществ. Так, добавление суспензии УНТ к водному раствору зонда (1) не привело к изменениям параметров спектра ЭПР — триплета, что свидетельствует об отсутствии нековалентного взаимодействия зонда с липофильными нанотрубками. Спектры ЭПР липофильного радикала (2) в суспензии УНТ показали расщепление низкополевой компоненты $h + 1$, что обусловило нахождение части зонда в воде, а другой части — в липофильном окружении. Добавление уширителя привело к исчезновению всего сигнала ЭПР, что говорит о доступности обеих частей зонда (2) для воды и водных растворов. Мы интерпретируем этот факт как частичное нековалентное взаимодействие (налипание липофильного зонда на липофильную нанотрубку с внешней стороны) радикала и нанотрубки (рис. 4).

Таким образом, фактически впервые был применен метод спиновых зондов для исследования цитотоксичности наноматериалов (УНТ) и развития нанотехнологий (системы доставки лекарственных веществ, медицинская биотехнология). Преимущества метода связаны с мгновенной оценкой влияния параметров микроокружения зонда (микровязкость, полярность, микрорельеф поверхности, редокс-потенциал) на параметры его спектров ЭПР, а также с небольшими размерами зондов (в пределах 1 нм), что хорошо вписывается в диапазон размеров исследуемых наноструктур и значительно меньше в диапазон размеров биологических объектов (белков, клеток, субклеточных структур и др.).

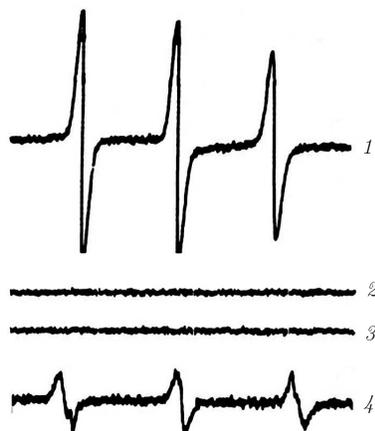


Рис. 4. Спектры ЭПР липофильного зонда (2): 1 — в водном растворе; 2 — смеси зонда и уширителя; 3 — смеси зонда, уширителя и УНТ; 4 — зонда в суспензии УНТ

Другим важным аспектом эффективности спиновых зондов является то, что метод позволяет работать с очень сложными, оптически непрозрачными биологическими объектами и судить о состоянии их отдельных структур или фрагментов путем регистрации изменений параметров микроокружения собственно парамагнитной метки.

Полученные в работе данные показывают, что цитотоксичность УНТ связана не только с изменением мембранных структур клеток, но и воздействием на их функциональные свойства.

1. *Iijima S.* Helical microtubules of graphitic carbon // *Nature*. – 1991. – **354**. – P. 56–58.
2. *Toxicology of Carbon Nanomaterials* // *Carbon (Special Issue)*. – 2006. – **44**, No 6. – P. 1027–1120.
3. *Sinha N., Yeow J. T.-W.* Carbon nanotubes for biomedical applications // *IEEE Transactions on Nanobioscience*. – 2005. – **4**, No 2. – P. 180–195.
4. *Rey D. A., Batt C. A., Miller J. C.* Carbon nanotubes in biomedical applications // *Nanotechnology Law @ Business*. – 2006. – **3**, No 3. – P. 263–292.
5. *Carbon nanotubes for biological and biomedical application* / W. Yang, P. Thordarson, J.J. Gooding et al. // *Nanotechnology*. – 2007. – No 18. – P. 1–12.
6. *Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells* / Porter A. E., Gass M., Muller K. et al. // *Nature Nanotechnology*. – 2007. – **2**. – P. 713–717.
7. *Lin Zhu, Dong Wook Chang, Liming Dai et al.* DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells // *Nano Lett.* – 2007. – **7**, No 12. – P. 3592–3597.
8. *Schipper M. L., Nakayama-Ratchford N., Davis C. R. et al.* A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice // *Nature Nanotechnology*. – 2008. – **3**, No 4. – P. 216–221.
9. *Лихтенштейн Г. И.* Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – Москва: Наука, 1974. – С. 12–24.
10. *Семенов Ю. И., Мележук А. В., Приходько Г. П и др.* Синтез, структура, физико-химические свойства нанотрубок // *Физикохимия наноматериалов и супрамолекулярных структур* / Под ред. А. П. Шпака, П. П. Горбика. – Киев: Наук. думка, 2007. – Т. 2. – С. 116–158.
11. *Cherkashina D. V., Semenchenko O. A., Grischuk V. P. et al.* Supplementation with fetal-specific factors ameliorates oxidative liver damage during hypothermic storage and reperfusion in a rat model // *Cell preservation technology*. – 2005. – **3**, No 3. – P. 201–208.
12. А. с. 1049808 СССР, 1983. – Способ определения степени деструкции клеток / Л. В. Иванов, В. А. Моисеев и др. – Опубл. 23.06.83; Бюл. № 39.
13. *Раков Э. Г.* Химия и применение углеродных нанотрубок // *Успехи химии*. – 2001. – **70**, № 10. – С. 934–973.

14. Нардід О. А. Відновлення спінового зонда в оцінці життєздатності біологічних об'єктів // Фізика живого. – 2008. – 16, № 1. – С. 44–49.

*Институт химии поверхности
им. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев
Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков
Национальный фармацевтический
университет Украины, Харьков*

Поступило в редакцию 13.01.2009

Corresponding Member of the NAS of Ukraine **N. T. Kartel**, Academician of the NAS of Ukraine **V. I. Grischenko**, Corresponding Member of the NAS of Ukraine **V. P. Chernukh**, **L. V. Ivanov**, **O. A. Nardid**, **Yu. I. Sementsov**, **G. P. Prikhod'ko**, **S. N. Kovalenko**, **Yu. I. Gubin**, **S. V. Repina**

Application of the spin label method to estimate cytotoxicity of carbon nanotubes

To study the mechanisms of cytotoxicity of carbon nanotubes (CNT), we have applied the modified method of spin labels. It is shown that the damage of erythrocytes membranes under the influence of CNT develops in time. In particular, under the introduction of a CNT suspension at a concentration from 10 to 200 mkg/ml during 2 days at a temperature of 6 °C, the amount of damaged erythrocytes was 25%. The exposition of liver homogenate with CNT for 4 h at a temperature of 0 °C leads to a considerable decrease of the mitochondrial activity (to the inhibition of a chain of transfer of electrons in mitochondria). The obtained data show that the cytotoxicity caused by the action of CNT is connected not only with a change of membrane structures of cells, but also influence their functional properties.