

О. В. Ременяк, С. В. Прилуцька, Ю. І. Прилуцький,
О. П. Матишевська

Порівняльний аналіз цитотоксичності вуглецевих нанотрубок

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)

Встановлено, що вуглецеві нанотрубки залежно від їх типу та концентрації в середовищі інкубації прискорюють процеси гемолізу еритроцитів щура та знижують життєздатність клітин за умов *in vitro*. Показано, що одностінні вуглецеві нанотрубки в концентрації $\geq 0,5$ мг/мл, а багатостінні в концентрації $\geq 0,1$ мг/мл спричиняють токсичну дію на тимоцити та клітини лейкозу L1210, яка має часо- та дозозалежний характер.

Вуглецеві нанотрубки (ВНТ) — це циліндричні структури, поверхня яких вкрита гексагональною сіткою з атомами вуглецю у вузлах (згорнутий шар графену). Залежно від кількості згорнутих і вкладених один в один шарів графену розрізняють одностінні (ОВНТ) і багатостінні ВНТ (БВНТ). Завдяки своїм унікальним фізико-хімічним властивостям ВНТ [1] є перспективним матеріалом для застосування в нанобіотехнології [2], зокрема для культивування м'язових та нервових клітин, відновлення кісток та хрящів, знешкодження ракових клітин. Здатність ВНТ ціленаправлено транспортувати лікарські речовини до біологічних мішеней викликає неабиякий інтерес у дослідників [3]. Однак суперечливий характер даних літератури щодо цитотоксичності ВНТ [4] залишається перешкодою в їх практичному застосуванні.

У зв'язку з вищесказаним нами досліджено вплив ОВНТ та БВНТ у різних концентраціях на стійкість еритроцитів до гемолізу та на життєздатність тимоцитів і клітин лейкозу L1210 за умов *in vitro*.

Матеріали і методи. Водні суспензії ОВНТ та БВНТ було синтезовано в Технічному університеті Ілменау (Німеччина) за методикою [5]. Діаметр ОВНТ та БВНТ становив 1,4–2 та 8–12 нм відповідно. Їх довжина не перевищувала 1–4 мкм.

Еритроцити, отримані з гепаринізованої крові щурів, інкубували протягом 1 год при 25 °С без добавок (контроль) та в присутності ВНТ у концентраціях 0,01, 0,05, 0,1 та 0,5 мг/мл. Гемоліз еритроцитів викликали 0,002 н НСІ. Вимірювання кінетики гемолізу проводили протягом 2 хв через кожні 10 с на спектрофотометрі "Scinco" (Німеччина) при $\lambda = 630$ нм. Побудову еритрограм (залежність відсотка еритроцитів у суспензії від часу гемолізу) здійснювали як описано в роботі [6].

Тимоцити отримували шляхом перетирання тимуса щурів лінії Вістар у середовище RPMI 1640. Клітини лейкозу L1210 виділяли на 8-му — 12-ту добу після внутрішньочеревного перещеплення їх безпородним мишам масою 20 г. Клітини $((2 \div 5) \cdot 10^6$ /мл) інкубували протягом 4 та 24 год у середовищі RPMI 1640 з додаванням 8 мМ NaHCO₃, 20 мМ HEPES, 5% сироватки, стрептоміцину та пеніциліну (10 мкг та 10 од на 1 мл середовища відповідно) без добавок (контроль) та в присутності ВНТ у концентраціях 0,01, 0,1 та 0,5 мг/мл при 37 °С у термостаті. Кількість життєздатних клітин підраховували в камері Горяєва з використанням 0,4% трипанового синього.

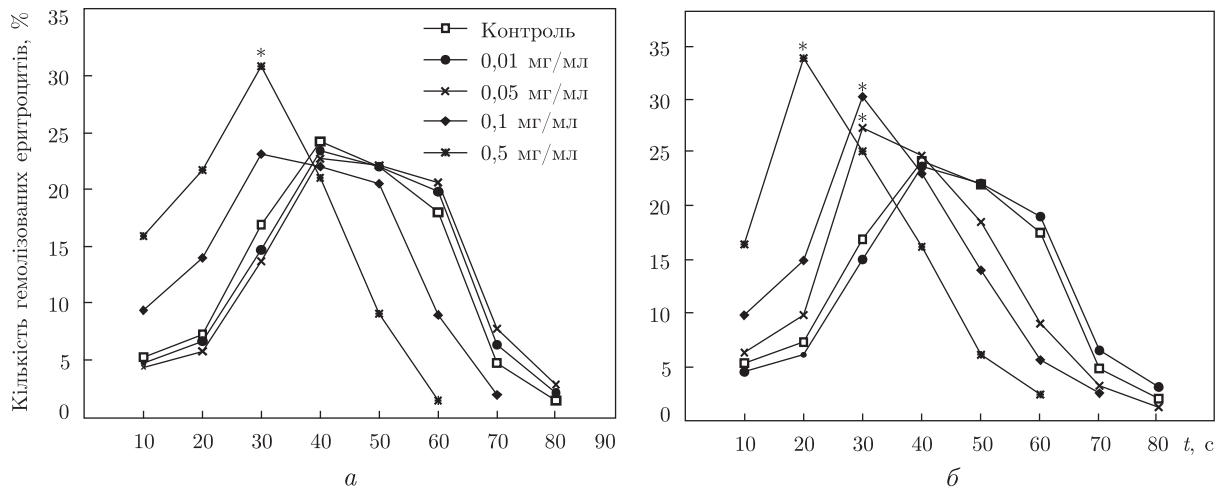


Рис. 1. Динаміка гемолізу еритроцитів щура, інкубованих без добавок (контроль) та в присутності ОВНТ (а) і БВНТ (б) за різних концентрацій.
* $P < 0,05$ порівняно з контролем

Життєздатність клітин оцінювали за тестом з МТТ [7]. Клітини $((1 \div 10) \cdot 10^5 / \text{мл})$ інкубували в 96-лунковому планшеті при 37°C за відсутності (контроль) та в присутності ВНТ у концентраціях 0,01, 0,1 та 0,5 мг/мл протягом 4 та 24 год до внесення МТТ. Основним принципом методу є відновлення МТТ (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолію бромід) активними формами кисню, у результаті чого утворюється формазан і виникає фіолетове забарвлення. Вміст утвореного формазану визначали на цифровому спектрофотометрі ІФКО-2 (АВОТЕК, Росія) при $\lambda = 570 \text{ нм}$.

Статистичну обробку результатів досліджень та побудову графіків проводили з використанням прикладних програм “Microsoft Excel 98” та “Origin 8”.

Результати та їх обговорення. Цитотоксичність ВНТ на клітинному рівні оцінювали за такими показниками, як гемолітична активність та вплив на життєздатність тимоцитів і клітин L1210 у суспензії.

Спочатку досліджували вплив ВНТ на стійкість еритроцитів щура до гемолізу. Для цього еритроцити інкубували протягом 60 хв без добавок (контроль) та в присутності ВНТ за різних концентрацій.

Згідно з одержаними результатами, показники гемолізу еритроцитів, інкубованих у присутності ОВНТ у концентраціях 0,01 та 0,05 мг/мл, не відрізнялися від контрольних значень (рис. 1, а). Процес гемолізу відбувався протягом 80 с, максимальна кількість гемолізованих еритроцитів щура становила 24,2%, а час максимального гемолізу спостерігався на 40 с. Однак за умови преінкубації еритроцитів у присутності 0,1 мг/мл ОВНТ гемоліз завершувався на 70 с, що свідчить про прискорення процесу гемолізу. Після преінкубації еритроцитів у присутності 0,5 мг/мл ОВНТ частка гемолізованих еритроцитів зростала до 30,8% на 30 с, а процес завершувався на 60 с. Вміст гемолізованих еритроцитів на початку гемолізу (на 10 с) збільшувався в 3 рази відносно контролю.

БВНТ у концентраціях 0,01 мг/мл не впливали на показники гемолізу еритроцитів, тоді як у присутності 0,05 мг/мл БВНТ максимальна кількість гемолізованих еритроцитів зростала з 24,2 до 27,3% (див. рис. 1, б). У присутності 0,1 та 0,5 мг/мл БВНТ стійкість еритроцитів до дії гемолітика знижувалась — загальний час гемолізу вкорочу-

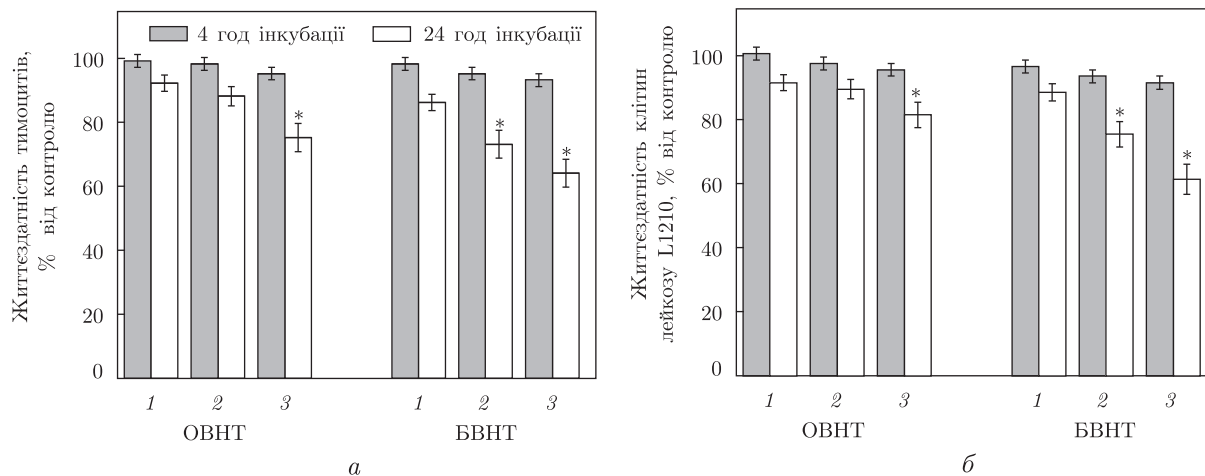


Рис. 2. Життєздатність тимоцитів (а) і клітин лейкозу L1210 (б) (% від контролю) за МТТ-тестом після 4 та 24 год інкубації в присутності ОВНТ та БВНТ у концентраціях 0,01 мг/мл (1), 0,1 мг/мл (2) та 0,5 мг/мл (3).

* $P < 0,05$ порівняно з контролем

вався, а максимальна кількість гемолізованих еритроцитів зростала до 30,2 та 33,8% відповідно.

На підставі отриманих результатів можна припустити, що ОВНТ у концентрації $\geq 0,1$ мг/мл та БВНТ у концентрації $\geq 0,05$ мг/мл здатні взаємодіяти з мембраною еритроцитів і спричиняти її ушкодження, що призводить до зниження стійкості еритроцитів до дії досліджуваного гемолітика. Оскільки БВНТ мають значно більший діаметр, ніж ОВНТ, вони можуть більшою мірою пошкоджувати мембрану еритроцитів внаслідок перфорації.

На наступному етапі досліджували вплив ВНТ на життєздатність тимоцитів та клітин L1210, яку оцінювали за допомогою МТТ-тесту.

Життєздатність тимоцитів та клітин лейкозу L1210 за МТТ-тестом за відсутності ВНТ через 4 год інкубації становила $(0,38 \pm 0,2)$ та $(0,81 \pm 0,07)$ опт. од./год відповідно, а через 24 год інкубації — $(0,30 \pm 0,1)$ та $(0,91 \pm 0,07)$ опт. од./год. Ці показники відповідно до типу клітин та термінів інкубації було прийнято за 100% і використано як контроль.

Як свідчать результати дослідження (рис. 2), життєздатність тимоцитів та клітин L1210 через 4 год інкубації в присутності 0,01, 0,1 та 0,5 мг/мл як ОВНТ, так і БВНТ не змінювалась. Через 24 год дії ВНТ спостерігались негативні ефекти на клітини, які залежали від типу клітин, типу ВНТ та їх концентрації в середовищі інкубації. Як виявилося, ОВНТ справляли менш токсичний вплив на клітини обох типів порівняно з БВНТ. Так, через 24 год інкубації життєздатність клітин знизилась лише в присутності 0,5 мг/мл ОВНТ: тимоцитів — на 25% (див. рис. 2, а), клітин L1210 — на 19% (див. рис. 2, б) відносно контролю. БВНТ більшою мірою впливали на життєздатність клітин, а саме через 24 год інкубації тимоцитів у присутності 0,1 і 0,5 мг/мл БВНТ цей показник знизився на 27 і 36% відповідно (див. рис. 2, а), а клітин L1210 — на 25 і 39% (див. рис. 2, б) відносно контролю.

Отже, цитотоксичні ефекти ВНТ виявляються залежно від їх типу і концентрації в середовищі, від термінів інкубації та типу клітин. БВНТ характеризуються більш токсичною дією на еритроцити, тимоцити та клітини лейкозу L1210, ніж ОВНТ. Цитотоксичний ефект ОВНТ спостерігається за концентрації $\geq 0,5$ мг/мл, а БВНТ — за концентрації $\geq 0,1$ мг/мл і має часо- та дозозалежний характер, що, на нашу думку, пов'язано зі здатністю ВНТ

взаємодіяти з клітинними мембранами [3]. Ці результати досліджень узгоджуються з даними літератури [8, 9], згідно з якими ОВНТ та БВНТ у концентраціях від 0,1 до 0,8 мг/мл обумовлюють часо- та дозозалежне зниження життєздатності легеневих клітин A549 та Т-лімфоцитів людини.

З отриманих результатів досліджень можна зробити такі висновки:

у присутності ВНТ процес гемолізу еритроцитів прискорюється залежно від їх концентрації в середовищі інкубації. БВНТ більшою мірою знижують стійкість еритроцитів до дії гемолітика порівняно з ОВНТ;

ОВНТ у концентрації $\geq 0,5$ мг/мл та БВНТ у концентрації $\geq 0,1$ мг/мл виявляють токсичну дію на тимоцити та клітини лейкозу L1210, яка має часо- та дозозалежний характер.

1. Ременяк О. В., Гончаренко Ю. В., Прилуцька С. В. Вуглецеві нанотрубки для нанобіотехнології. Фізичні властивості // Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. – 2008. – № 4. – С. 279–284.
2. Прилуцька С. В., Ременяк О. В., Гончаренко Ю. В., Прилуцький Ю. І. Вуглецеві нанотрубки як новий клас матеріалів для нанобіотехнології // Біотехнологія. – 2009. – 2, № 2. – С. 55–66.
3. Ременяк О. В., Прилуцька С. В., Бичко А. В. та ін. Мембранотропна дія вуглецевих нанотрубок // Доп. НАН України. – 2009. – № 2. – С. 163–167.
4. Tejral G., Panyala N. R., Havel J. Carbon nanotubes: toxicological impact on human health and environment // J. Appl. Biomed. – 2009. – 7. – P. 1–13.
5. Prylutska S. V., Grynyuk I. I., Matyshevska O. P. et al. Estimation of multi-walled carbon nanotubes toxicity *in vitro* // Physica E. – 2008. – 40, No 7. – P. 2565–2569.
6. Терсков И. А., Гительзон И. И. Метод химических (кислотных) эритрограмм // Биофизика. – 1957. – 2, вып. 2. – С. 259–566.
7. Carmichael J., DeGraff W. G., Gazdar A. F. et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing // Cancer Res. – 1987. – 15, No 47(4). – P. 936–942.
8. Bottini M., Bruckner S., Nika K. et al. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis // Toxicol. Lett. – 2006. – 160. – P. 121–126.
9. Davoren M., Herzog E., Casey A. et al. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells // Toxicol in vitro. – 2007. – 21. – P. 438–448.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 03.07.2009

O. V. Remeniak, S. V. Prylutska, Yu. I. Prylutsky, O. P. Matyshevska

Comparative analysis of cytotoxicity of carbon nanotubes

We show that CNTs, depending on their type and concentrations in the incubation medium, accelerate the rat erythrocyte haemolysis and decrease the cells viability in vitro. SWCNTs at the concentration ≥ 0.5 mg/ml and MWCNTs at the concentration ≥ 0.1 mg/ml exhibit toxic effects on thymocytes and cells of leukemia L1210 which have time- and dose-dependent character.