

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК МЕТОДОМ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ

Н.Т. Каргель¹, В.И. Грищенко², В.П. Черных³, Л.В. Иванов³,
О.А. Нардид², Ю.И. Семенцов¹, Г.П. Приходько¹,
С.Н. Коваленко³, Ю.И. Губин³, С.В. Репина²

¹Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины
ул. Генерала Наумова 17, 03164 Киев-164

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;

³Национальный фармацевтический университет Украины, Харьков

Для изучения механизмов цитотоксичности углеродных нанотрубок (УНТ) применили модификации метода спиновых зондов, позволяющие количественно определять влияние УНТ на целостность мембран эритроцитов человека и митохондриальную активность гомогената печени крыс без извлечения митохондрий из клеток гепатоцитов.

Показано, что повреждение мембран эритроцитов под действием УНТ развивается во времени: введение суспензии УНТ при концентрации от 10 мкг/мл до 200 мкг/мл в первый момент не приводит к нарушению мембран эритроцитов, однако через 2 сут экспозиции образцов при температуре 6 °С для концентраций УНТ 10, 50, 100 и 200 мкг/мл количество поврежденных эритроцитов составляло соответственно 4, 10, 16 и 25 %. Экспозиция гомогената печени с УНТ в течение 4 ч при температуре 0 °С приводит к значительному снижению митохондриальной активности (ингибированию цепи передачи электронов в митохондриях). Полученные данные показывают, что цитотоксичность, обусловленная действием УНТ, связана не только с изменением мембранных структур клеток, но и воздействием на их функциональные свойства.

Со времени открытия углеродных нанотрубок (УНТ) в 1991 году Иидзимой [1] (фактически повторно [2]) вопрос об их токсичности остается одним из ключевых. Действительно, практическое использование этих уникальных по свойствам наноструктур в биотехнологии, молекулярной биологии и медицине может, естественно, осложняться из-за возможного неблагоприятного воздействия УНТ на субклеточные и клеточные структуры, а также в целом на органы и ткани живого организма. Как и для любых иных наночастиц проявление биологических и токсических эффектов УНТ должно определяться их формой, размером, природой примесей, зарядом, дозой, способами поступления, концентрацией в области органа-мишени, продолжительностью воздействия и другими факторами. В связи с этим с 2001 года 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*, чему посвящен ряд обстоятельных статей и обзоров [3–7]. Полученные к настоящему времени данные о легочной токсичности, раздражимости кожи, цитотоксичности, биосовместимости, воздействии на окружающую среду, а также терапевтическом действии УНТ противоречивы и не дают четкой картины об уровне безвредности и безопасности таких наноматериалов для живого организма. Ясно лишь, что наименее токсичными и наиболее совместимыми явля-

ются рафинированные (очищенные) одностенные трубки небольшой длины, имеющие также химически модифицированную поверхность и функционализацию. Известно также, что УНТ способны преодолевать мембраны клеток, проникать в цитоплазму, а в некоторых случаях и в ядра. Кроме того, эмпирическим путем установлен и концентрационный предел цитотоксичности УНТ, составляющий для суспензий трубок примерно 10 мкг/мл.

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 [8, 9], то в отношении митохондрий, находящихся внутри клеток, данных о влиянии УНТ на их активность в настоящее время нет, несмотря на ключевую роль митохондрий для жизнеспособности клеток. Это связано в первую очередь с ограниченностью возможностей физических методов, используемых при изучении таких сложных биологических систем, как клетки, в присутствии достаточно крупных и громоздких с точки зрения молекулярной биологии углеродных наноматериалов.

Для изучения механизмов токсичности УНТ на молекулярном и мембранном уровнях предложено использовать метод спиновых зондов. Он давно успешно используется в молекулярной биологии и фармакологии. Например, по спектрам электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) стабильного нитроксильного радикала (зонда), введенного во взвесь клеток или белков, судят о микровязкости и полярности микроокружения зонда, конформационных изменениях в белках и мембранах, текучести липидов и целостности мембран, активности окислительно-восстановительных процессов в клетках и тканях [10]. Метод спиновых зондов позволяет изучать непрозрачные растворы и вязкие взвеси биообъектов, а также исследовать не только суспензии клеток, но и образцы биологических тканей кожи, печени, почки, мышечной и нервной ткани.

Целью работы явилось изучение с помощью спиновых зондов механизмов цитотоксичности углеродных нанотрубок. Для этого прослежена целостность мембран эритроцитов крови человека и митохондриальную активность гомогената печени крыс в присутствии суспензий УНТ. Кроме этого, исследовано непосредственное взаимодействие (образование супрамолекулярных комплексов) УНТ с гидрофильным и липофильным зондами, рассматриваемых в качестве парамагнитных моделей лекарственных веществ.

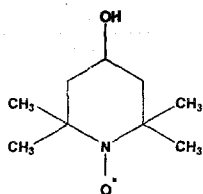
В работе использовали высококачественные многостенные УНТ, полученные на пилотной установке, разработанной Институтом химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины и ООО «ТМСпецмаш» (г. Киев), путем конденсации продуктов каталитического пиролиза непредельных углеводородов [11]. Внутренний диаметр нанотрубок составляет 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, описанной в [12].

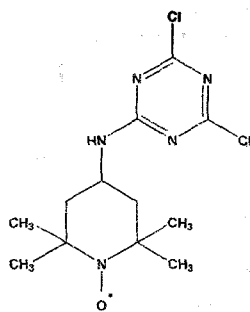
В качестве парамагнитных зондов использован водорастворимый иминоксильный радикал: 2,2,6,6,-тетраметил-4-оксо-пиперидин-1-оксил (1) и липофильный иминоксильный радикал 2,2,6,6,-тетраметил-4-оксо-пиперидин-1-цианурхлорид (2).

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) выдерживали в течение необходимого времени экспозиции и необходимой температуры без УНТ, а другой (опытный)

выдерживали в течение времени экспозиции с суспензией УНТ. После экспозиции к образцам добавляли 0,1 мл стандартного раствора спинового зонда и уширителя (феррицианида калия), а затем регистрировали спектры ЭПР с помощью радиоспектрометра (Bruker ER 100 D, Германия). Таким образом, учитывалось старение клеток при экспозиции. Аналогичный опыт проводили со взвесью гепатоцитов. Контакт эритроцитов с УНТ осуществляли в течение 2 сут при температуре 6 °С, а гомогената печени – в течение 4 ч при 0 °С.



1



2

Ранее для изучения целостности изолированных клеток и клеток образцов тканей одним из авторов данной статьи [13] был разработан и 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 (вследствие диполь-дипольного и обменного взаимодействия) линии сверхтонкой структуры спектра ЭПР зонда, находящегося во внеклеточной среде. В результате этого регистрируется спектр ЭПР зонда, находящегося исключительно внутри клеток. При нарушении целостности мембран – появлении дефектов, разрывов, дырок в мембране уширитель мгновенно проникает внутрь клеток и дезавуирует сигнал ЭПР зонда внутри клеток. Интенсивность спектра ЭПР от зонда, находящегося внутри клеток, пропорциональна количеству целых клеток в суспензии (в %). Ошибка метода в определении неповрежденных клеток не превышает 3 %.

Этот способ можно реализовать в ином плане: вначале получить раствор зонда с уширителем (нулевая линия), затем добавить взвесь клеток, получив спектр ЭПР (триплет) от зондов, проникших внутрь клеток, затем изучать целостность клеток. Появление триплета в этом случае показывает, что внутриклеточная среда недоступна для уширителя.

В данной работе использован этот способ для оценки влияния УНТ на целостность мембран эритроцитов. При этом принято к сведению данные многочисленных исследований [3 – 7], что порог токсических эффектов, вызываемых суспензиями УНТ, может наблюдаться при концентрации порядка 10 мкг/мл для клеток.

В наших опытах было показано, что добавление суспензий УНТ с концентрациями 10, 50, 100 и 200 мкг/мл к суспензии эритроцитов после 10 минутной 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 уже 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 [3 – 7], что 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).

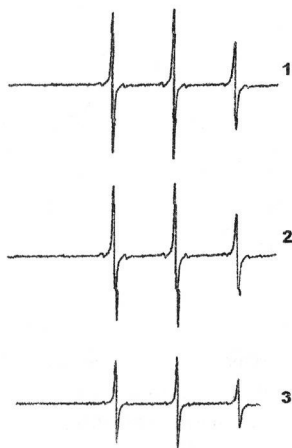


Рис. 1. Спектры ЭПР спинового зонда в цитозоле эритроцитов донорской крови после инкубации 2 сут при температуре 6 °С с УНТ различной концентрации: 1 – контроль; 2 – 10, 3 – 200 мкг/мл.

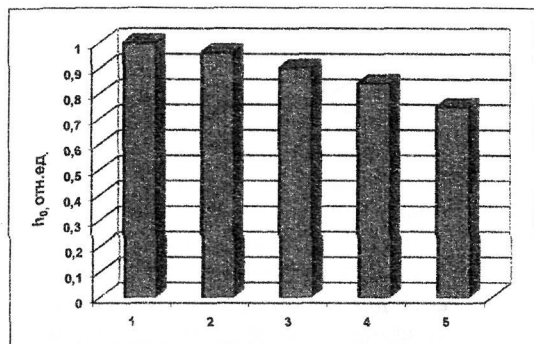


Рис. 2. Влияние инкубации эритроцитов донорской крови с УНТ различной концентрации на интенсивность центрального компонента спектра ЭПР парамагнитного зонда (1): 1 – контроль; 2 – 10, 3 – 50, 4 – 100, 5 – 200 мкг/мл.

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.

Затяжной характер эффекта разрушения эритроцитов, как и других клеток, согласно данным литературы, может быть объяснен несколькими факторами:

- большие размеры нанотрубок;
- большая поверхность контакта между мембранами клеток и нанотрубкой;
- липофильность УНТ, которая, из-за гидрофильности поверхности мембран, имеющих полярные головки фосфолипидов и гликокаликс (полисахариды со связанной водой), мешает нанотрубкам быстро погрузиться в липидный бислой мембраны и осуществить трансмембранную диффузию внутрь клеток.

Современные бифокальные и просвечивающие микроскопы позволяют запечатлеть и регистрировать изменения формы мембраны клеток и других клеточных структур в статике, отделять контуры трубки от контуров клеточных структур. Однако непосредственно наблюдать повреждения и разрывы в мембранах порядка 0,5 – 1 нм, очевидно, крайне затруднительно. 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 [14]. Поэтому предположено, что нанотрубки могут существенно повлиять на биохимические процессы, протекающие в митохондриях, нейронах, кардиомиоцитах и др. и связанные с переносом электронов или зарядов. В связи с этим использована модификация 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 [15]. Восстановление зонда (1) до непарамагнитного гидроксилamina осуществляется сильным антиоксидантом – коэнзимом Q_{10} дыхательной цепи митохондрий. При этом интенсивность спектра ЭПР экспоненциально снижается во времени. При логарифмировании таких кривых, получаются 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.

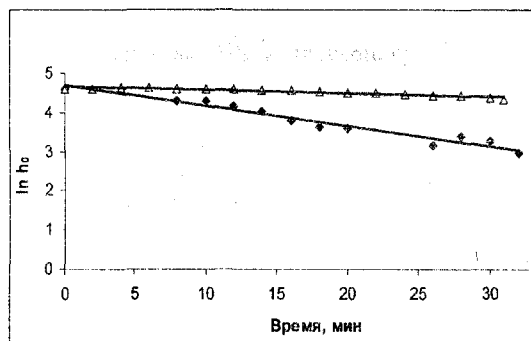


Рис. 3. Восстановление спинового зонда в гомогенате печени после 4 ч инкубации: \blacklozenge – контроль; \triangle – с 200 мкг/мл УНТ.

Из рис. 3 видно, что присутствие УНТ в суспензии гепатоцитов после 4 ч экспозиции приводит к ингибированию цепи переноса электронов в митохондриях в несколько раз (т.е. к существенному снижению митохондриальной активности клеток). Таким образом, для гепатоцитов механизм токсичности нанотрубок состоит не только в преодолении и разрушении цитоплазматической мембраны, но и последующим за этим ингибировании дыхательной цепи митохондрий гепатоцитов.

Полученные данные дают основание полагать, что предложенный метод исследования цитотоксичности УНТ является уникальной возможностью получать важнейшую информацию в отношении активности митохондрий без разрушения клеток для их извлечения (как обычно делают биохимики), а также в отношении влияния проводящих нанотрубок на электрохимические процессы внутри клетки. Возможно, в механизме ингибирования лежат механические повреждения митохондрий, как субклеточных структур. Возможно, взаимодействие проводящих нанотрубок с митохондриями (параллельное соединение проводников) приводит к частичному перераспределению и утечке электронов дыхательной цепи на нанотрубки, что вызывает уменьшение потока электронов в митохондриях и снижение скорости восстановления нитроксильного радикала (зонда). Нельзя

также исключать и того, что нанотрубки могут обусловить повреждение митохондрий посредством генерации активных форм кислорода [8], либо образованием газовых кислородных электродов и микрогальванических пар, приводящих к электрохимическому повреждению (своеобразной «коррозии») митохондрий.

В работе было 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 приводило к изменениям параметров спектра ЭПР – триплета, что свидетельствовало об отсутствии нековалентного взаимодействия зонда с липофильными нанотрубками. Спектры ЭПР липофильного радикала (2) в суспензии УНТ показали расщепление низкополевой компоненты $h+1$, как следствие нахождения части зонда в воде, а другой части в липофильном окружении. Добавление ушрителя приводило к исчезновению всего сигнала ЭПР, что говорило о доступности обеих частей зонда (2) для воды и водных растворов. Этот факт можно интерпретировать как частичное нековалентное взаимодействие (налипание липофильного зонда на липофильную нанотрубку с внешней стороны) радикала и нанотрубки (рис. 4).

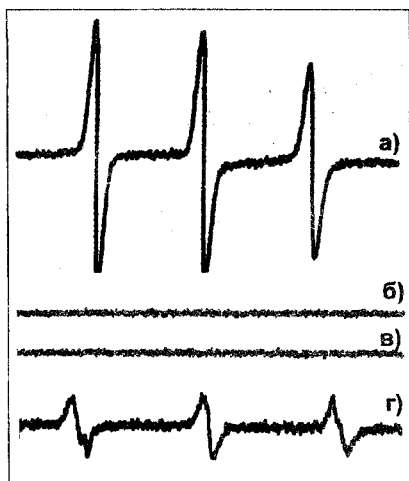


Рис. 4. Спектры ЭПР липофильного зонда (2): в водном растворе (а); смеси зонда и ушрителя (б); смеси зонда, ушрителя и УНТ (в); зонда в суспензии УНТ (г).

Таким образом, применение фактически впервые метода спиновых зондов в области исследования цитотоксичности наноматериалов (УНТ) и развития нанотехнологий (системы доставки лекарственных веществ, медицинская биотехнология) показали его большие возможности. 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 размеров биологических объектов (молекул белков, клеток, субклеточных структур и др.).

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, обусловленная

действием УНТ, связана не только с изменением мембранных структур клеток, но и воздействием на их функциональные свойства.

Литература

1. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon // *Nature*. – 1991. – V. 354. – P. 56 – 58.
2. Радущкевич Л.В., Лукьянович В.М. О структуре углерода, образующегося при термическом разложении окиси углерода на железном контакте // *Журн. физ. химии*. – 1952. – Т. 26, № 1. – С. 88 – 95.
3. Toxicology of Carbon Nanomaterials // *Carbon (Special Iss.)*. – 2006. – V. 44, № 6. – P. 1027 – 1120.
4. Sinha N., Yeow J.T.-W. Carbon nanotubes for biomedical applications // *IEEE Transactions on Nanobioscience*. – 2005. – V. 4, № 2. – P. 180 – 195.
5. Rey D.A., Batt C.A., Miller J.C. Carbon nanotubes in biomedical applications // *Nanotechnology Law @ Business*. – 2006. – V. 3, № 3. – P. 263 – 292.
6. Carbon nanotubes for biological and biomedical application / W. Yang, P. Thordarson, J. Gooding *et al.* // *Nanotechnology*. – 2007. – № 18. – P. 1 – 12.
7. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells / Alexandra E. Porter, Mhairi Gass, Karin Muller *et al.* // *Nature Nanotechnology*. – 2007. – V. 2. – P. 713 – 717.
8. DNA Damage Induced by Multiwalled Carbon Nanotubes in Mouse Embryonic Stem Cells / Lin Zhu, Dong Wook Chang, Liming Dai *et al.* // *Nano Lett.* – 2007. – V. 7, № 12. – P. 3592 – 3597.
9. A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice / Schipper, M.L., Nakayama-Ratchford, N., Davis, C.R. *et al.* // *Nature Nanotechnology*. – 2008. – V. 3, № 4. – P. 216 – 221.
10. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – С. 12 – 24.
11. Семенцов Ю.И., Мележик А.В., Приходько Г.П. Синтез, структура, физико-химические свойства наноуглеродных материалов // *Физикохимия наноматериалов и супрамолекулярных структур* / Под ред. А.П.Шпака, П.П.Горбика. – Киев: Наук. думка, 2007. – Т. 2. – С. 116 – 158.
12. Supplementation with fetal-specific factors ameliorates oxidative liver damage during hypothermic storage and reperfusion in a rat model / Cherkashina D.V., Semenchenko O.A., Grischuk V.P. *et al.* // *Cell preservation technology*. – 2005. – V. 3, № 3. – P. 201 – 208.
13. Иванов Л.В., Моисеев В.А. Способ определения степени деструкции клеток // *Авт. свид. СССР 1049808*, 1983. – Оpubл. 23.06.1983, Бюл. № 39.
14. Раков Э.Г. Химия и применение углеродных нанотрубок // *Успехи химии*, 2001. – Т. 70, № 10. – С. 934 – 973.
15. Нардід О.А. Відновлення спінового зонда в оцінці життєздатності біологічних об'єктів // *Фізика живого*. – 2008. – Т. 16, № 1. – С. 44 – 49.