

## ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК МЕТОДОМ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ

Н.Т. Картель<sup>1</sup>, В.И. Грищенко<sup>2</sup>, В.П. Черных<sup>3</sup>, Л.В. Иванов<sup>3</sup>,  
О.А. Нардид<sup>2</sup>, Ю.И. Семенов<sup>1</sup>, Г.П. Приходько<sup>1</sup>,  
С.Н. Коваленко<sup>3</sup>, Ю.И. Губин<sup>3</sup>, С.В. Репина<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков;

<sup>3</sup>Национальный 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 вязкости 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.

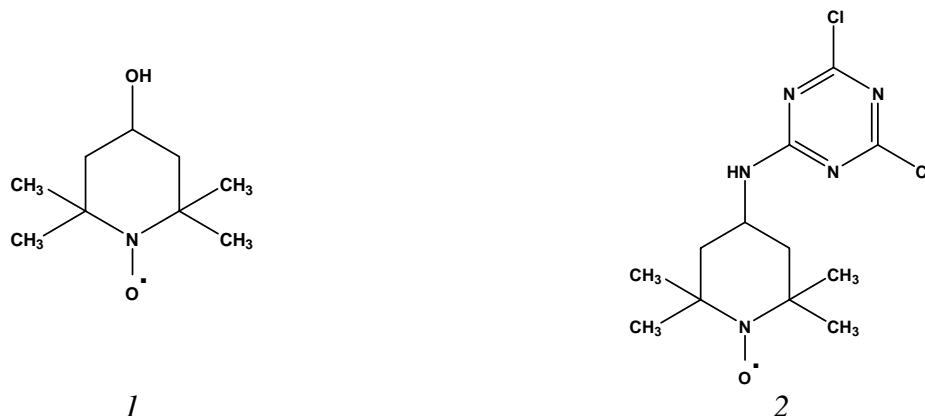
В работе использовали высокочистые многостенные УНТ, полученные на пилотной установке, разработанной Институтом химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины и ООО «ТМСпецмаш» (г. Киев), путем конденсации продуктов каталитического пиролиза непредельных углеводородов [11]. Внутренний диаметр нанотрубок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



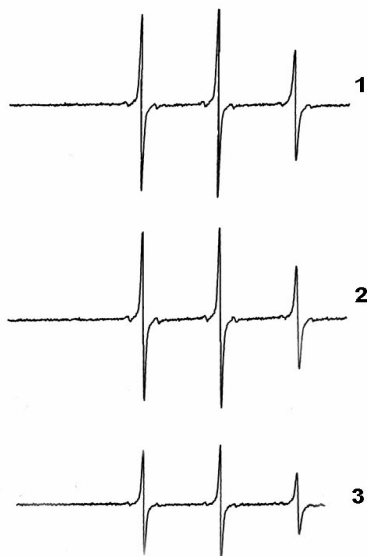
Ранее для изучения целостности изолированных клеток и клеток образцов тканей одним из авторов данной статьи [13] был разработан и предложен количественный экспресс-метод, в котором в суспензию клеток вводят парамагнитный зонд (1), быстро проникающий внутрь клеток; далее вводят уширитель спектров ЭПР – 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.

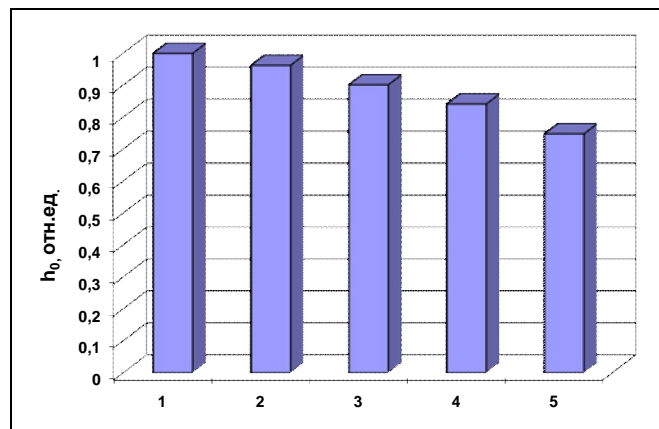
В данной работе использован этот способ для оценки влияния УНТ на целостность мембран эритроцитов. При этом принято к сведению данные многочисленных исследований [3 – 7], что порог токсических эффектов, вызываемых суспензиями УНТ, может наблюдаться при концентрации порядка 10 мкг/мл для клеток.

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.

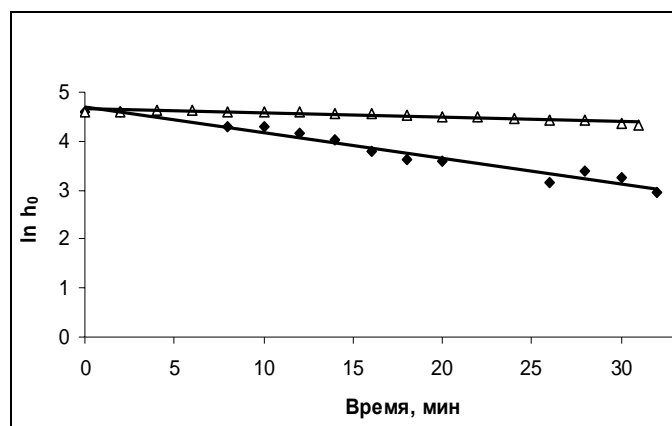
Затяжной характер эффекта разрушения эритроцитов, как и других клеток, согласно данным литературы, может быть объяснен несколькими факторами:

- 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.



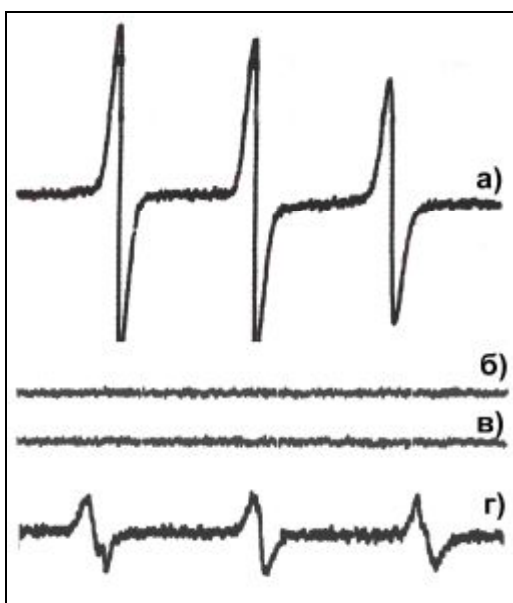
**Рис. 3.** Восстановление спинового зонда в гомогенате печени после 4 ч инкубации:  $\blacklozenge$  – контроль;  $\blacktriangle$  – с 200 мкг/мл УНТ.

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 уширителя 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 уширителя (б); смеси зонда, уширителя 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. – Опубл. 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.

# A STUDY ON CITOTOXICITY OF CARBON NANOTUBES BY MEANS OF SPIN PROBE METHOD

**N.T. Kartel<sup>1</sup>, V.I. Grischenko<sup>2</sup>, V.P. Chernykh<sup>3</sup>, L.V. Ivanov<sup>3</sup>,  
O.A. Nardid<sup>2</sup>, Yu.I. Sementsov<sup>1</sup>, G.P. Prikhod'ko<sup>1</sup>, S.N. Kovalenko<sup>3</sup>,  
Yu.I. Gubin<sup>3</sup>, and S.V. Repina<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine  
General Naumov Str. 17, 03164 Kyiv-164*

<sup>2</sup>*Institute of Cryobiology and Cryomedicine Problems  
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv,*

<sup>3</sup>*National Pharmaceutical University of Ukraine, Kharkiv*

*In order to study toxicity mechanisms of carbon nanotubes (CNT), modifications of spin probe method have been applied allowing us to determine quantitatively the CNT effect on membrane integrity of human erythrocytes and on mitochondrial activity of rat liver homogenate without extraction of mitochondria from hepatocyte cells.*

*CNT-induced damage of erythrocyte membranes has been shown to be time-germinating: an introduction of CNT suspension with concentration of 10 to 20 mcg/ml firstly does not result in erythrocyte membrane disturbance but in 2 days after sample exposition at 6 °C with CNT concentrations of 10, 50, 100, and 200 mcg/ml the amount of damaged erythrocytes was 4, 10, 16, and 25 per cent respectively. An exposition of liver homogenate to CNT for 4 hours at 0°C results in a considerable decrease in the mitochondrial activity (inhibition of the chain of electron transfer in mitochondria). The data obtained show the CNT-induced cytotoxicity to be caused not only by changes in cell membrane structures but also by affecting their functional properties.*