

АКТИВИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК НА СПЕРМАТОЗОИДЫ

Л.В. Иванов¹, М.Й. Крамар², В.П. Черных¹, С.Н. Коваленко¹,
Н.Т. Картель³, Ю.И. Губин¹

¹Национальный фармацевтический университет Украины,
61002 Харьков, ул. Пушкинская, 53, E-mail: x123@ua.fm;

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
61015 Украина, г. Харьков, ул. Переяславская, 23, E-mail: gordienko@gala.net;

³Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины,
03164 Украина, Киев, ул. Генерала Наумова, 17, E-mail: nikar@kartel.kiev.ua.

Суспензии обычных или окисленных многослойных углеродных нанотрубок в концентрации 10–200 мкг/мл, вводимые в образцы спермы, не оказывают цитотоксического действия на сперматозоиды. Более того, при невысоких и средних концентрациях нанотрубок (10–40 мкг/мл) наблюдается активизация сперматозоидов – количество активных клеток в течение времени их жизнеспособности возрастает в ряде случаев более чем на 20%.

Введение

В настоящее время наблюдается повышенный интерес к наноуглеродным образованиям (фуллеренам, наноалмазам, нанотрубкам, графенам и др.) вследствие наличия у них комплекса особых, зачастую уникальных свойств [1, 2]. По объему исследований и практического использования углеродным нанотрубкам (УНТ) принадлежит доминирующее положение среди углеродных наноматериалов. Во многом это обусловлено относительной легкостью получения нанотрубок, воспроизводимостью свойств и возможностью их варьирования в широких пределах. В то же время остаются открытыми и дискуссионными вопросы безвредности, токсичности, биосовместимости, а также экологической безопасности УНТ при их массовом производстве и применении. Действительно, использование этих нанообъектов в биотехнологиях, молекулярной биологии и медицине носит потенциально опасный характер из-за способности УНТ воздействовать на субклеточные и клеточные структуры, а также в целом на органы и ткани живых организмов. Именно поэтому, начиная с 2001 года (т.е. практически через десять лет после официального открытия нанотрубок), развернуты систематические исследования токсичности УНТ, результаты которых противоречивы и неоднозначны (см. обзорные статьи [3–6]). В особенности это относится к данным о цитотоксичности и цитосовместимости УНТ. В зависимости от вида клеток результаты могут свидетельствовать как о чрезвычайно высокой токсичности (кератиноциты, нейтрофилы, фагоцитарные клетки, макрофаги, клетки почек эмбриона и др.), так и о полной безвредности, совместимости и даже стимулирующем действии на рост клеток (остеобласты, фибробласты, астроциты, аксоны, нейрональные клетки, яйцеклетки китайского хомячка и др.).

В свою очередь, исследованные в упомянутых работах [3–6] УНТ имели разное происхождение (методы получения), размеры, чистоту, структуру и химию поверхности, что также во многом может предопределять их токсичность или биосовместимость.

Системные и сравнительные исследования механизмов токсичности требуют использования, с одной стороны, стандартизованных углеродных материалов, а с

другой, – проверки действия наночастиц на объекты с различным белковым и фосфолипидным составом, не одинаковыми размерами и формой клеток, а также различной доступностью УНТ к клеточным органеллам. В связи с этим нами начато всестороннее исследование механизмов воздействия стандартизованных по характеристикам УНТ на различные клетки и клеточные структуры с использованием метода спиновых меток, электропорации и визуального наблюдения во времени [7, 8]. Весьма интересным объектом исследования являются, на наш взгляд, клетки спермиев (сперматозоидов). Несмотря на сравнительно короткий (до нескольких часов) период жизни этих клеток, их биологические особенности (плазматическая мембрана и акросома, представляющие собой липопротеидные и гликопротеидные образования, плотность упаковки белков и нуклеиновых кислот в ядре, малое содержание воды, низкий уровень метаболизма в неподвижном состоянии) предопределяют большую устойчивость к внешним воздействиям [9, 10].

Данная работа посвящена оценке влияния УНТ на биоэнергетическую активность сперматозоидов, что для мужских гамет является интегральным показателем их фертильности и фактически может свидетельствовать о цитотоксичности и/или цитосовместимости изучаемого углеродного наноматериала.

Материалы и методы

В работе использовали суммарную фракцию высокочистых многостенных УНТ, полученных на пилотной установке, разработанной Институтом химии поверхности им. А.А.Чуйко НАН Украины и ООО «ГМСпецмаш» (г. Киев) путем каталитического пиролиза непредельных углеводородов. Внутренний диаметр нанотрубок составляет 1–2 нм, внешний 10–40 нм, зольность – менее 0,4%, содержание нанотрубок – более 95%. Использовали также окисленную модификацию УНТ, получаемую в результате обработки азотной кислотой. Получение водных суспензий УНТ с различной концентрацией проводили по методике [7].

Для исследования подвижности сперматозоидов в присутствии УНТ применяли эякуляты, полученные у мужчин с нормозооспермией. Образцы спермы помещали в стерильные чашки Петри и выдерживали 40–60 мин в термостате при 37 °С с целью разжижения. Концентрацию и подвижность сперматозоидов определяли в камере Makler (Израиль) в согласии с рекомендациями ВОЗ [11]. Для обеспечения в образцах спермы необходимой концентрации нанотрубок вначале готовили концентрированные суспензии УНТ в растворе Хенкса, а затем 0,05 мл (невысокие и средние концентрации УНТ) или 0,1 мл (высокие концентрации УНТ) суспензии добавляли к 1 мл эякулята. В экспериментах определяли общее содержание сперматозоидов в исходных образцах, а также фракцию сперматозоидов с быстрым (группа А) и медленным (группа Б) поступательным прямолинейным движением. Средняя ошибка количественных определений групп А и Б не превышала 10%.

Результаты и их обсуждение

Снижение естественной подвижности во времени сперматозоидов (старение) имеет, по нашим представлениям, те же причины, что и для других клеток, ферментов и ДНК – частичная денатурация белковых структур, снижение ферментативной активности, пероксидное окисление липидов мембран (увеличение проницаемости мембран), инактивация субклеточных структур, а также истощение собственных ресурсов обеспечения жизнедеятельности.

Следует учитывать тот факт, что данные литературы [3–6] и наши собственные кинетические исследования [7, 8] по снижению митохондриальной активности гепатоцитов в гомогенате печени крыс и изменению целостности мембран эритроцитов

человека под действием нанотрубок свидетельствуют о развитии этих процессов в период от нескольких часов до нескольких суток. В связи с этим подсчет активных (подвижных) сперматозоидов (А+Б) в присутствии УНТ проводили через определенные промежутки времени в течение 4 ч, т.е. фактически в течение полного периода жизнеспособности данных клеток.

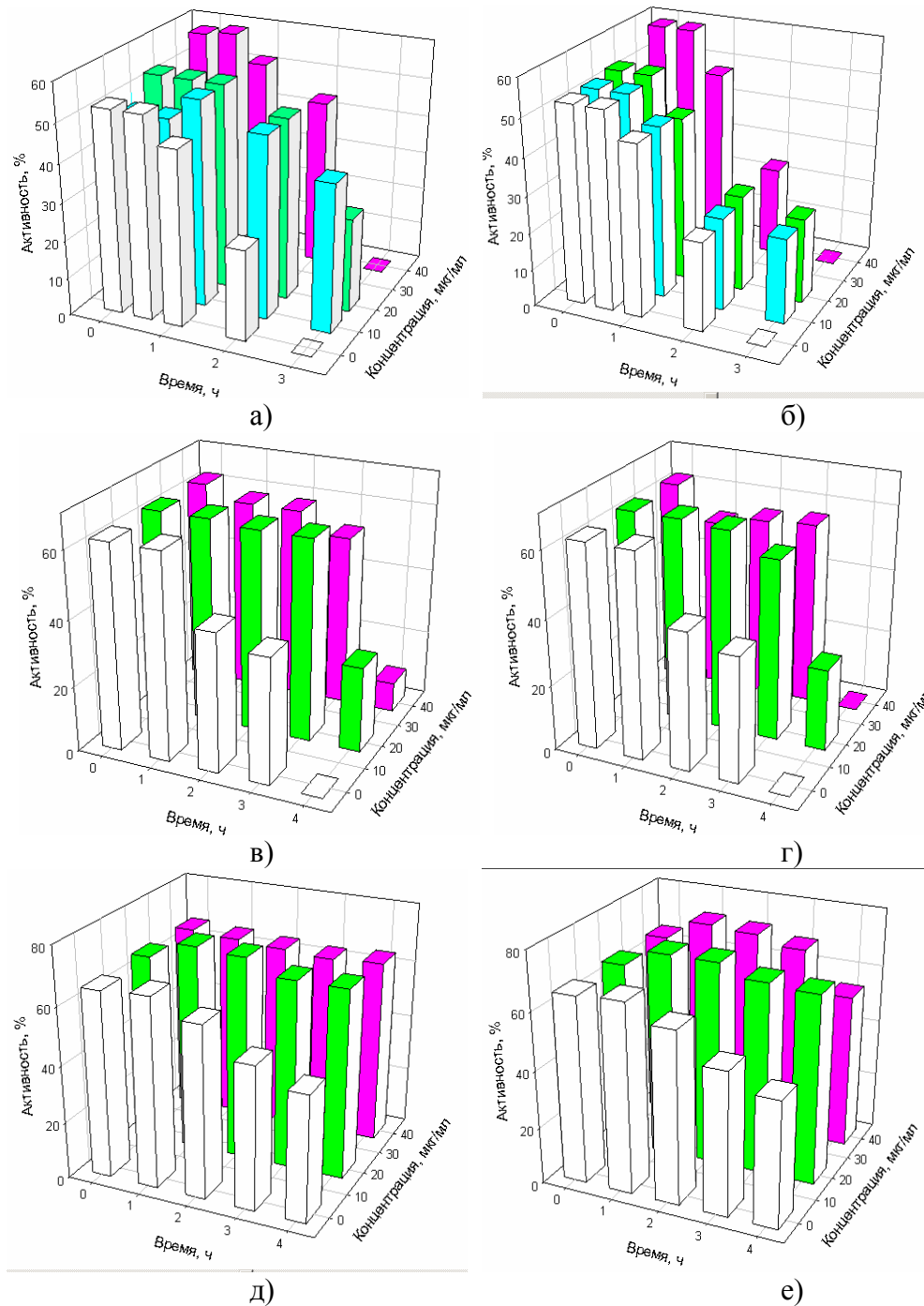


Рис. 1. Диаграммы снижения активности сперматозоидов при исходной концентрации клеток $1,2 \cdot 10^7$ /мл (а, б); $4,2 \cdot 10^7$ /мл (в, г) и $3,0 \cdot 10^7$ /мл (д, е) без контакта с УНТ и в присутствии обычных (а, в, д) и окисленных (б, г, е) УНТ с концентрацией 10, 20 и 40 мкг/мл.

На рис. 1 представлены диаграммы, демонстрирующие кинетику снижения активности сперматозоидов в различных образцах спермы, а также для этих же образцов в присутствии УНТ с концентрациями 10, 20 и 40 мкг/мл. Анализ полученных результатов показал, что в течение 1–2 ч активность сперматозоидов существенно не меняется, а затем резко падает и через 4 ч приближается к нулю. В то же время присутствие малых и средних (10–40 мкг/мл) концентраций обычных и окисленных УНТ в образцах спермы не приводит к снижению подвижности сперматозоидов на фоне постепенного естественного падения их подвижности. Таким образом, малые и средние концентрации УНТ не обладали цитотоксическим действием на сперматозоиды в течение всего эксперимента. Более того, прослеживается явно выраженная тенденция активационного действия нанотрубок при малых и средних концентрациях (10–40 мкг/мл), когда наблюдаемая активность сперматозоидов в присутствии нанотрубок достоверно выше их активности в исходной сперме, начиная со второго часа наблюдения. В ряде случаев активационный эффект от УНТ достигал более 20%. Сравнение результатов для окисленных и обычных УНТ не показал существенных отличий в их действии на сперматозоиды.

При введении больших концентраций УНТ – 100 и 200 мкг/мл (рис. 2) – также не наблюдалось какого-либо падения подвижности сперматозоидов по сравнению с контролем, что указывает на отсутствие цитотоксического эффекта. Вместе с тем при больших концентрациях УНТ не отмечался их активационный эффект на сперматозоиды.

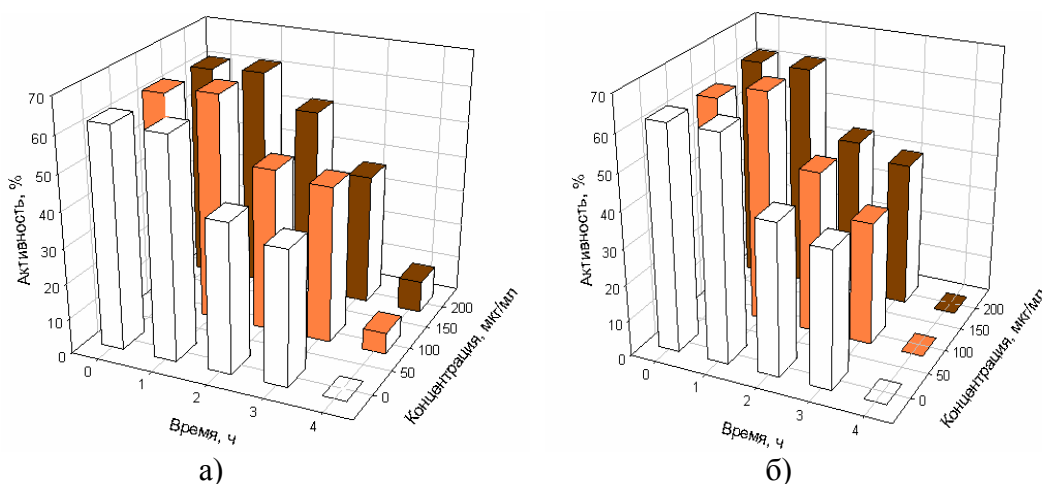


Рис. 2. Диаграммы снижения активности сперматозоидов при исходной концентрации клеток $4,2 \cdot 10^7$ /мл без контакта с УНТ и в присутствии обычных (а) и окисленных (б) УНТ с концентрацией 100 и 200 мкг/мл.

Отсутствие цитотоксичности нанотрубок в отношении сперматозоидов уместно сравнить с полученными ранее данными по инактивации митохондрий гепатоцитов в гомогенате печени и нарушении целостности мембран эритроцитов [7, 8]. Для нарушения цитоплазматической мембраны требуется, очевидно, время до нескольких дней. Процесс инактивации митохондрий под действием УНТ, протекающий в течение нескольких часов, существенно зависит от резистентности цитоплазматической мембраны и доступности субклеточной структуры, находящейся внутри клетки, к достаточно большим и громоздким наночастицам, каковыми являются нанотрубки. Например известно [3], что только нанотрубки с длиной меньше 200 нм способны проникать (диффундировать) через мембрану внутрь клеток.

Возможно, цитотоксичное действие УНТ, связанное с ингибированием цепи

дыхания митохондрий в клетках, зависит от мембранотропных свойств нанотрубок, скорости их трансмембранной диффузии внутрь клеток и соотношения размеров нанотрубки и клетки, что в конечном итоге определяет эффективные концентрации нанотрубок у поверхности мембран митохондрий внутри клеток. В литературе, к сожалению, пока практически нет данных об избирательной мембранотропности нанотрубок, зависящей прежде всего от белкового и фосфолипидного состава мембран и их вязкости (текучести), определяющей – скорость трансмембранной диффузии.

Ранее [12] с помощью липофильных спиновых зондов (спин-меченого стероида и спин-меченого амида пальмитиновой кислоты) на основе анализа спектров ЭПР были получены данные о микровязкости различных мембран – липидов модельных мембран липосом, мембран эритроцитов, сперматозоидов, митохондрий гепатоцитов, а также мембран клеток сосудов (аорты, артерии, бедренной вены крыс). Анализ спектров ЭПР одних и тех же спиновых зондов, введенных во взвеси различных клеток, показал их достаточно различающуюся вращательную подвижность в тех или иных мембранах. Время корреляции вращательной диффузии спинового зонда τ_c в мембранах, которое прямо пропорционально вязкости, рассчитывали по спектрам ЭПР исходя из теории Мак-Конелла [13]. При этом также учитывали формулу Стокса-Эйнштейна:

$$\tau_c = 4\pi a^3 \eta / 3kT,$$

где: η – вязкость среды (в нашем случае – вязкость липидного слоя мембран), a – эффективный радиус спинового зонда.

С использованием спин-меченого стероида [12] нами показано, что величина вязкости липидного слоя мембран различных клеток увеличивается в ряду:

$$\text{липосомы} < \text{митохондрии} < \text{спермии} < \text{эритроциты}.$$

Использование спин-меченого амида пальмитиновой кислоты [12] в мембранах клеток тканей различных сосудов показало, что вязкость мембран растет также в соответствии со значениями τ_c :

$$\text{вена} (\tau_c = 0,53 \pm 0,06 \cdot 10^9 \text{ c}) < \text{аорта} (\tau_c = 0,76 \pm 0,07 \cdot 10^9 \text{ c}) < \text{артерия} (\tau_c = 1,5 \pm 0,015 \cdot 10^9 \text{ c}).$$

На примере клеток тканей сосудов четко видно, что вязкость липидов мембран, и, следовательно, время трансмембранной диффузии веществ может отличаться в несколько раз.

Таким образом, при высоких значениях вязкости цитоплазматической мембраны клетки проникновение крупных нанотрубок может быть настолько медленным, что они просто не успевают это сделать за время проведения эксперимента. По-видимому, этот вариант мы и наблюдаем в случае контакта УНТ со сперматозоидами, что и воспринимается как отсутствие у нанотрубок цитотоксичности. С точки зрения предложенных представлений хорошо объяснимо «медленное» разрушение мембран эритроцитов под действием УНТ, наблюдаемое в течение 2 суток, и сравнительно «быстрая» реакция на УНТ митохондрий гепатоцитов, обнаруженные нами ранее методом спиновых зондов [7, 8].

Особого внимания заслуживает обнаруженный нами факт активирующего действия УНТ в малых концентрациях на сперматозоиды. Поскольку время жизни сперматозоидов невелико, а также с учетом того, что эти клетки не размножаются, мы не можем говорить о каком-либо способствовании их пролиферации, как это наблюдается в отношении ряда клеток костной и нервной ткани [3], либо в случае дрожжевых клеток, что отмечалось нами ранее [14]. В случае сперматозоидов мы, по-видимому, имеем дело

с протекторной функцией нанотрубок, выступающих в качестве своеобразных цитосорбентов. Учитывая известные сорбционно-каталитические свойства углеродных материалов, можно предположить, что нанотрубки ингибируют процесс пероксидного окисления липидов и очищают (сорбируют) среду обитания сперматозоидов от токсических продуктов их метаболизма.

Косвенным подтверждением высказанного предположения служит тот факт, что модификация (окисление) нанотрубок не приводит к существенному изменению наблюдаемого результата – сорбционная и ингибирующая способность окисленных нанотрубок сохраняется. Протекторная функция УНТ и приводит в конечном итоге к увеличению доли активных сперматозоидов на определенном временном интервале их существования. Отсутствие подобного активирующего действия в случае больших концентраций УНТ можно объяснить тем, что «передозировка» цитосорбента ведет, скорее всего, к обеднению концентрации питательных веществ среды, необходимых для нормального существования сперматозоидов, и возможно к развитию начальной стадии проникновения нанотрубок в клетку – взаимодействия с мембраной. Из этого следует, что активирующее действие УНТ на сперматозоиды наблюдается при определенном оптимальном их соотношении.

Выводы

Проведенными исследованиями показано, что в присутствии обычных и окисленных углеродных нанотрубок с концентрациями 10, 20, 40, 100 и 200 мкг/мл подвижность сперматозоидов в образцах спермы не снижается в течение всего периода их жизнедеятельности (до 4 ч и более). Это дает основание констатировать, что углеродные нанотрубки не оказывают на сперматозоиды цитотоксического воздействия.

При небольших концентрациях (10–40 мкг/мл) углеродные нанотрубки, по-видимому, проявляют свойства цитосорбента, оказывающего протекторное действие на клетки сперматозоидов. В результате этого после второго часа наблюдения количество активных (подвижных) клеток в сперме в присутствии УНТ выше, чем в контрольных образцах в ряде случаев более чем на 20%.

Литература

1. Раков Е.Г. Химия и применение углеродных нанотрубок // Успехи химии, 2001. – Т. 70, №10. – С. 934–973.
2. Шпак А.П., Куницкий Ю.А., Карбовский В.Л. Кластерные и наноструктурные материалы. – Киев: Академперіодика, 2001. – 588 с.
3. Toxicology of carbon nanomaterials // Carbon (Special Issue). - 2006. – V. 44, N6. – P. 1027–1120.
4. Sinha N., Yeow J.T.-W. Carbon nanotubes for biomedical applications // IEEE Transac. on Nanobioscie.. – 2005. – V. 4, N2. - P. 180–195.
5. Rey D.A., Batt C.A., Miller J.C. Carbon nanotubes in biomedical applications // Nanotechnology law and business. – 2006. – V. 3, №3. – P. 263–292.
6. Carbon nanotubes for biological and biomedical application / W. Yang, P. Thordarson, J.J. Gooding et al. // Nanotechnology. – 2007. – №18. – P. 1–12.
7. Изучение цитотоксичности углеродных нанотрубок методом спиновых зондов / Н.Т. Картель, В.И. Грищенко, В.П. Черных и др.// Химия, физика и технология поверхности. 2008. – № 14. – С. 557–564.
8. Использование метода спиновых зондов для оценки цитотоксичности углеродных нанотрубок / Н.Т. Картель, В.И. Грищенко, В.П. Черных и др.// Доп. НАН України. – 2009. – №8. – С. 127–133.

9. Mark S.R., Zaneveld L.J. Acromal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa // Gamete Res. – 1987. – V.18. – P.375–383.
10. James P.S., Wolfe C.A., Mackie A. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa // Hum. Reprod. – 1999. – V. 14. – P. 1827-1832.
11. World Health Organization. Laboratory manual for examination of human semen-cervical mucus interaction. – Cambridge: Press Syndicate of Universities of Cambridge, 1997. – P. 22.
12. Иванов Л.В. Иванов Л.В., Орлова И.Н. Биофармацевтические исследования, направленные на оптимизацию состава, свойств и пути введения лекарственных препаратов // Технология и стандартизация лекарств. – Харьков, 2000. – Т. 2. – С. 558-615.
13. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – С. 12–24.
14. Изучение механизмов цитотоксичности углеродных нанотрубок / Л.В. Иванов, В.П. Черных, Н.Т. Картель и др. // Хімія, фізика та технологія модифікування поверхні. – Київ: ІХП НАН України, 2009. – С. 34–36.

ACTIVATION ACTION OF CARBON NANOTUBES ON SPERMATOZOIDS

**L.V. Ivanov¹, M.I. Kramar², V.P. Chernykh¹, S.N. Kovalenko¹,
N.T. Kartel³, Yu.I. Gubin¹**

¹*National Pharmaceutical University of Ukraine,
61002 Kharkov, Pushkinskaya str., 53, E-mail: x123@ua.fm;*

²*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine,
61015 Kharkov, Pereyaslovskaya str., 23, E-mail: gordienko@gala.net;*

³*Chuiko Institute of Surface Chemistry, NAS of Ukraine,
03164 Kiev, General Naumov str., 17, E-mail: nikar@kartel.kiev.ua.*

Suspensions of usual or oxidized multi-walled carbon nanotubes in concentration of 10-200 µg/ml entered in samples of sperm do not render cytotoxic action on spermatozooids. Moreover, at low and middle concentrations of nanotubes (10-40 µg/ml) are observed the activation of spermatozooids – the quantity of active cells during time of their viability increases in some cases more than on 20%.

АКТИВУЮЧА ДІЯ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОТРУБОК НА СПЕРМАТОЗОЇДИ

**Л.В. Іванов¹, М.І. Крамар², В.П. Черних¹, С.Н. Коваленко¹,
М.Т. Картель³, Ю.І. Губін¹**

¹*Національний фармацевтичний університет України,
61002 Харків, вул. Пушкінська, 53, E-mail: x123@ua.fm;*

²*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
61015 Україна, г. Харків, ул. Переяславська, 23, E-mail: gordienko@gala.net;*

³*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України,
03164 Україна, Київ, в ул. Генерала Наумова, 17, E-mail: nikar@kartel.kiev.ua*

Суспензії звичайних або окислених багатошарових вуглецевих нанотрубок концентрації 10–200 мкг/мл, що вводились в зразки сперми, не спричиняють цитотоксичної дії на сперматозоїди. Більш того, при невисоких та середніх концентраціях нанотрубок (10 – 40 мкг/мл) спостерігається активізація сперматозоїдів – кількість активних клітин за час їхньої життєдіяльності зростає в деяких випадках більш ніж на 20 %.