

Академик НАН Украины Н. Т. Картель, Л. В. Иванов,
А. Н. Ляпунов, О. А. Нардид, А. В. Окотруб, И. А. Кирилук,
Я. О. Черкашина

Оценка влияния углеродных нанотрубок на микровязкость мембран эритроцитов методом спиновых зондов

С использованием метода спиновых зондов проведена оценка микровязкости мембран эритроцитов в присутствии углеродных нанотрубок (УНТ) различной структуры в течение короткого (4 ч) и длительного (24 ч) периодов инкубации. По данным спектров электронного парамагнитного резонанса липофильных иминоксильных радикалов определяли время корреляции вращательной диффузии зондов в мембранах, пропорциональное вязкости их липидного слоя. При длительной инкубации для всех нанотрубок характерна способность к увеличению микровязкости мембран эритроцитов в 1,5–2 раза. Способность УНТ воздействовать на микровязкость мембран эритроцитов зависит от размера трубок и их химии поверхности. Наибольший эффект оказывают гидрофильные (окисленные) многостенные нанотрубки. Меньшее воздействие наблюдается от гидрофобных многостенных трубок и их фрагментов, а одностенные нанотрубки характеризуются самым слабым воздействием на мембраны эритроцитов среди исследованного ряда УНТ.

Углеродные нанотрубки (УНТ) способны в течение суток проникать через липидный слой цитоплазматической мембраны внутрь клетки (трансмембранная диффузия), а также взаимодействовать с внутриклеточными органеллами, ядром и ДНК, в результате чего через определенный период (несколько суток) клетка погибает [1]. Логичным было бы предположить, что наблюдаемая трансмембранная диффузия нанотрубок внутрь клеток и соответственно их токсичность зависят от вязкости мембран, которая определяется, главным образом, плотностью упаковки в ней фосфолипидов. В настоящее время актуально изучение диффузии нанотрубок с иммобилизованными на их поверхности противоопухолевыми препаратами, как способ доставки лекарственных веществ внутрь раковых клеток [2, 3]. Однако данные о вязкости клеточных мембран в присутствии нанотрубок практически отсутствуют, хотя такие сведения крайне важны для систем доставки с помощью УНТ.

Уникальная информация о функциональных свойствах различных биологических объектов и сред может быть получена с использованием метода спиновых зондов [4, 5]. Так, ранее было показано, что метод спиновых зондов очень чувствителен к изменениям проницаемости и целостности мембран клеток, а также уровня их митохондриальной активности при контакте с УНТ и использовался нами для сравнительной оценки микровязкости мембран клеток различных органов и тканей [6, 7].

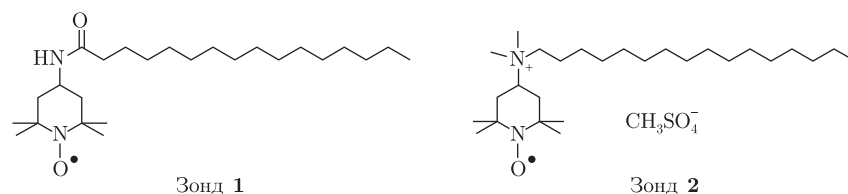
Цель настоящей работы заключается в выявлении влияния УНТ различной структуры на микровязкость мембран эритроцитов при контакте нанотрубок с эритроцитами и последующего проникновения вглубь мембраны клеток.

Материалы и методы исследований. В процессе работы применялся метод спиновых зондов, согласно которому по спектрам электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)

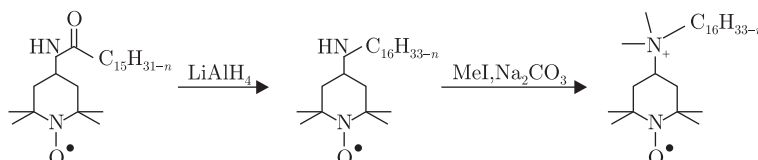
стабильных нитроксильных радикалов с липофильным органическим заместителем (что позволяет им внедриться в липофильный слой мембран эритроцитов) оценивали время корреляции броуновской вращательной диффузии зондов в мембранах клеток при их длительном контакте с нанотрубками.

Были выбраны два спиновых зонда на основе пальмитиновой кислоты.

Зонд **1** — нитроксильный радикал 4-пальмитоиламидо-ТЕМПО, полученный по методике [8]; зонд **2** — нитроксильный радикал 4-(N,N-диметил-N-гексадециламмоний)-ТЕМПО, содержащий в своем составе четвертичный аммониевый фрагмент, благодаря чему может рассматриваться как ионогенное поверхностно-активное вещество (ПАВ):



Зонд **2** синтезирован из зонда **1** по схеме



Введение зондов **1** или **2** в водную взвесь эритроцитов осуществляли добавлением концентрированного раствора зонда в ДМСО таким образом, чтобы конечная концентрация ДМСО во взвеси нанотрубок была в пределах 0,5–1%. Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрометре “ESR Spectrometer CMS8400”.

Были изучены несколько типов углеродных нанотрубок:

УНТ-К1 — суммарная фракция высокочистых многостенных нанотрубок (содержание более 95%), полученных методом CVD-синтеза на смешанном оксидном Al–Fe–Mo катализаторе аэрозольного типа. Внутренний диаметр нанотрубок ~1–2 нм, внешний ~10–40 нм, зольность — менее 0,4%;

УНТ-К2 — окисленная модификация УНТ-К, полученных в результате программированной обработки растворами азотной кислоты;

УНТ-Н1 — отмытые каркасные многослойные наночастицы, полученные при электродуговом синтезе без катализатора, средний размер фракции ~100 нм;

УНТ-Н2 — многостенные нанотрубки, полученные методом CVD-синтеза на катализаторе из железа. Длина ~10 мкм, внешний диаметр ~30–60 нм, деминерализованы кислотами, содержание инкапсулированного железа ~2%;

УНТ-Н3 — одностенные нанотрубки (содержание ~70%, без деминерализации), полученные на катализаторе из железа с добавками иных d- и f-металлов.

Нанотрубки серии К1 и К2 были получены в отделе физикохимии нанопористых и наноразмерных углеродных материалов Института химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины (Киев) [6], а серии Н1, Н2 и Н3 — в лаборатории физикохимии наночастиц Института неорганической химии СО РАН (Новосибирск) [9–11].

Эритроцитарную массу получали из крови крыс самцов путем трехкратного разбавления физиологическим раствором (0,9 % хлорид натрия), приготовленным на натрий-фос-



Рис. 1. Спектр ЭПР зонда **1** в эритроцитах при 25 °С

фатном буфере (5 ммоль/л, pH 7,2–7,4), и центрифугированием в течение 20 мин при скорости 3000 об/мин.

Надосадок после первого центрифугирования использовали в качестве плазмы. Перед введением взвеси УНТ во взвесь эритроцитов водную взвесь используемых нанотрубок подвергали воздействию ультразвука в течение 30 мин на установке *Ultrasonic Cleaner*. Образцы взвеси эритроцитов с изучаемыми УНТ инкубировали в течение 4 ч при 25 °С, а также 24 ч (6 ч при 25 °С и 18 ч при 5 °С).

Оценка вязкости проводилась на основе обработки интенсивности и ширины линий триплета ЭПР-спектров нитроксильных радикалов — спиновых зондов **1** и **2**, взаимодействующих с внешним окружением (плазма, поверхность нанотрубки, поверхность или липидная оболочка эритроцитов и т. д.) [4, 5]. Для расчета времени корреляции броуновской вращательной диффузии зонда (τ) используются следующие характеристики спектров: ширина центральной компоненты (ΔH_0), интенсивности компонентов спектра ЭПР (h_0, h_{+1}, h_{-1}) с магнитным квантовым числом ядра ^{14}N ($M = 0, +1, -1$), изотропная константа расщепления ($A_{\text{изо}}$). Для оценки вязкости любых сред базовым является уравнение Стокса–Эйнштейна:

$$\tau = \frac{4\pi a^3 \eta}{3kT}, \quad (1)$$

где η — вязкость среды; a — эффективный радиус спинового зонда, определяемый по спектрам ЭПР [7, 8].

Результаты и их обсуждение. Используемые липофильные спиновые зонды резко отличаются величиной положительного заряда на атоме азота возле нитроксильной “головки”. Исходя из этого, они могут несколько по-разному встраиваться в липидный бислой мембран клеток. Так, зонд **2**, по-видимому, встраивается в мембрану подобно фосфатидилхолину, имеющему положительно заряженную холиновую “головку” и два алкильных “хвоста”. Нитроксильный фрагмент зонда **2** с неспаренным электроном находится на границе раздела вода–мембрана и чувствителен к связыванию с мембраной таких крупных тел, как нанотрубки. Нейтральный зонд **1** не так жестко структурирован (ориентирован) в липидном бислое мембран эритроцитов и может находиться несколько глубже в мембране эритроцитов. Поэтому его спектр ЭПР не меняется при введении во взвесь эритроцитов феррицианида (уширителя сигнала), т. е. нитроксильный фрагмент зонда **1** недоступен воде. Это отражается на соответствующих спектрах ЭПР (ср. спектр зонда **1** в эритроцитах (рис. 1) со спектрами зонда **2** в контрольных опытах на рис. 2 и 3). Очевидно, что вращательная подвижность зонда **1** в мембране эритроцитов выше, чем у зонда **2**.

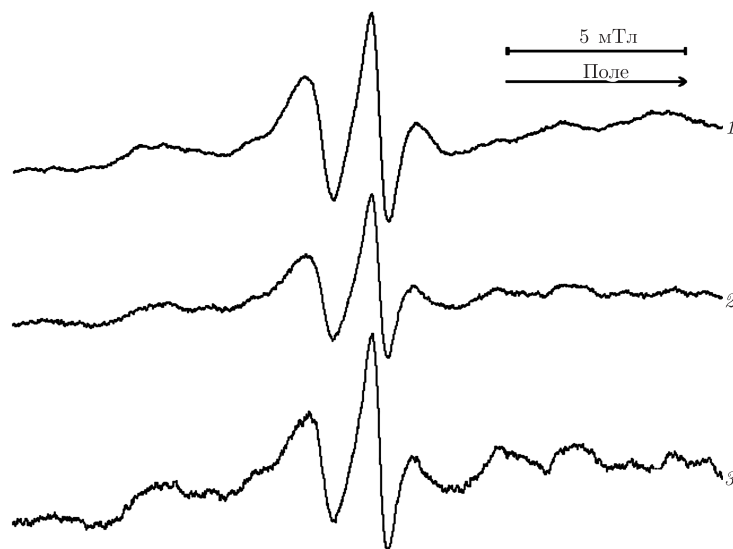


Рис. 2. Спектры ЭПР зонда **2** в эритроцитах: 1 — контроль; 2 — в присутствии взвеси УНТ-К1 (150 мкг/мл) через 4 ч инкубации; 3 — в присутствии взвеси УНТ-Н3 (150 мкг/мл) через 4 ч инкубации при 25 °С

Процесс трансмембранной диффузии УНТ внутрь клеток можно разделить на несколько последовательных этапов: сорбция на поверхности мембран клеток, проникновение во внутренние слои липидного бислоя мембран и выход во внутриклеточную среду (взаимодействие с внутриклеточными органеллами). Клетки эритроцитов не имеют внутриклеточных органелл, поэтому можно предположить, что по спектрам ЭПР зондов в мембране мы сможем наблюдать разную величину изменений вращательной подвижности зондов (микровязкости мембран) на период связывания УНТ с поверхностью мембран и во время длительного нахождения зондов во внутренних слоях мембран эритроцитов.

Наши предположения о различии в изменении микровязкости мембран эритроцитов на этапах сорбции УНТ на мембране (4 ч инкубации эритроцитов с УНТ) и глубокого проникновения их в мембрану (24 ч инкубации) получили экспериментальное подтверждение. Так, на этапе связывания УНТ с мембраной эритроцитов спектры ЭПР зонда **2** в мембране практически не отличаются от спектра для контрольного опыта (см. рис. 2). На этапе проникновения УНТ вглубь мембраны (см. рис. 3) наблюдается значительное изменение спектров — снижение интенсивности высокополевой компоненты спектра h_{-1} за счет уширения линии, увеличение параметров h_0/h_{+1} , h_{+1}/h_{-1} и h_0/h_{-1} , что свидетельствует о существенном уменьшении вращательной подвижности зонда в мембране (увеличении микровязкости мембран). Время корреляции броуновской вращательной диффузии зонда, пропорциональное вязкости мембраны, определяется из следующих эмпирических соотношений [4, 5]:

$$\frac{1}{\tau_{+1}} = \frac{2 \cdot 10^8}{[(\sqrt{h_0/h_{+1}} - 1)\Delta H_0]}, \text{ с}^{-1}; \quad (2a)$$

$$\frac{1}{\tau_{-1}} = \frac{3,6 \cdot 10^9}{[(\sqrt{h_0/h_{-1}} - 1)\Delta H_0]}, \text{ с}^{-1}; \quad (26)$$

$$\tau_{+1,-1} = 6,65 \cdot 10^{-10} (\sqrt{h_{+1}/h_{-1}} - 1) \Delta H_{+1}, \text{ с}. \quad (3)$$

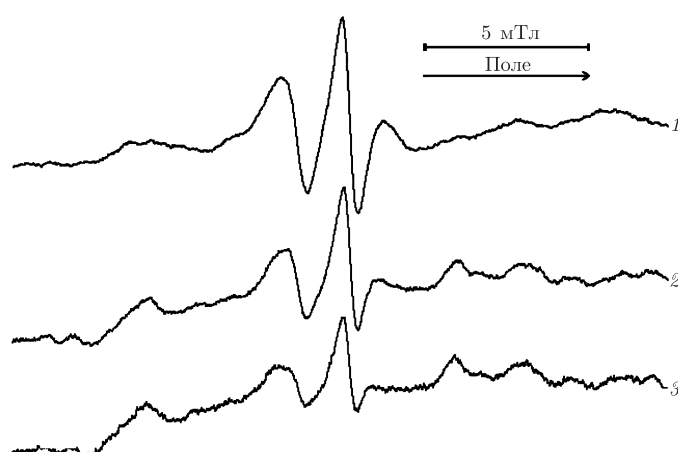


Рис. 3. Спектр ЭПР зонда **2** в эритроцитах: *1* — контроль; *2* — после 24 ч инкубации со взвесью УНТ-Н1 (150 мкг/мл); *3* — после 24 ч инкубации со взвесью УНТ-К2 (150 мкг/мл) при 25 °С

Значения времени корреляции, рассчитанные из спектров ЭПР зондов **1** и **2** в мембране эритроцитов в присутствии УНТ (150 мкг/мл) при температуре 25 °С, и оценку изменения вязкости мембран демонстрирует табл. 1. Расчет выполнен по формулам (2) и (3) с учетом геометрии зондов (вытянутые эллипсы) и анизотропии броуновской вращательной диффузии зондов — преимущественного вращения вокруг длинной оси молекулы. Для зонда **1** не представлялось возможным рассчитать τ после длительной инкубации нано-

Таблица 1

Система	Время инкубации, ч	$\tau_{+1} \cdot 10^9$, с	$\tau_{+1,-1} \cdot 10^9$, с	Вязкость, о. е.
Зонд 1				
Эритроциты (контроль)	—	2,54	5,20	1*
Эритроциты + УНТ-К1	4	3,40	4,67	0,90
Эритроциты + УНТ-К2	4	2,32	4,32	0,83
Эритроциты + УНТ-Н1	4	2,10	5,01	0,96
Эритроциты + УНТ-Н2	4	2,31	5,80	1,12
Эритроциты + УНТ-Н3	4	4,11	6,42	1,23
Зонд 2				
Эритроциты (контроль)	—	9,93	7,72	1*
Эритроциты + УНТ-К1	4	8,78	7,06	0,91
	24	14,2	14,3	1,85
Эритроциты + УНТ-К2	4	9,65	8,02	1,04
	24	12,4	17,7	2,29
Эритроциты + УНТ-Н1	4	9,05	9,24	1,20
	24	10,6	11,4	1,48
Эритроциты + УНТ-Н2	4	9,20	9,14	1,18
	24	14,6	14,8	1,92
Эритроциты + УНТ-Н3	4	10,5	8,37	1,08
	24	10,8	10,9	1,41

*Вязкость мембраны эритроцитов в контрольных опытах с зондами **1** и **2** (расчет $\tau_{+1,-1}$) принята за 1.

трубок с эритроцитами (24 ч) из-за значительного снижения вращательной подвижности зонда в мембране, уменьшения интенсивности спектров (уширение линий) и соответственно уменьшения параметра сигнал/шум. В анализе полученных данных мы опирались на совокупность значений τ_{+1} и $\tau_{+1,-1}$, однако значения $\tau_{+1,-1}$ более адекватно отражают броуновскую вращательную диффузию зондов вокруг длинной оси молекулы [4].

В нашем случае не имеют значения абсолютные значения τ или пропорциональные им величины микровязкости η мембран эритроцитов. Важны относительные изменения τ по сравнению с контролем, из чего можно судить о масштабе изменений микровязкости мембран под действием нанотрубок.

Анализ табл. 1 показал, что в ряде случаев первоначальная сорбция изучаемых нанотрубок на мембранах эритроцитов сопровождается некоторым уменьшением времени корреляции зонда **2** в мембране, т. е. ее микровязкость сначала уменьшается. По-видимому, это связано с нарушением структуры поверхностного слоя мембран эритроцитов под действием УНТ, нарушением взаимодействия и ориентации фосфолипидных головок их поверхностного липидного бислоя. Однако в дальнейшем (через сутки инкубации нанотрубок с эритроцитами) наблюдается значительное увеличение микровязкости мембран, что, скорее всего, связано с проникновением крупных по размерам нанобъектов (УНТ) внутрь мембраны. При длительной инкубации для всех нанотрубок характерна способность к увеличению микровязкости мембран эритроцитов в 1,5–2 раза. Результатом столь существенного повышения микровязкости мембран может быть нарушение структурной организации липидного бислоя, а также спектра интегрированных в нем белков. Это может быть одним из факторов, определяющих цитотоксичность УНТ. Следует отметить, что в работе изучали влияние на мембраны эритроцитов достаточно высоких концентраций УНТ, моделирующих тесный контакт нанотрубок с биосистемами, прежде всего клетками органов и тканей.

Анализ полученных данных дает основание утверждать, что имеется некоторая закономерность: значительное увеличение микровязкости мембран после длительной инкубации (24 ч) наблюдается в присутствии многостенных нанотрубок (УНТ-K1, УНТ-K2 и УНТ-H2). Для одностенных УНТ-H3 воздействие на вязкость мембран намного слабее, чем многостенных. Зонд **1**, менее структурированный в поверхностный слой мембран эритроцитов, оказался малоинформативным — отсутствовала заметная реакция (за исключением системы с УНТ-H3) на взаимодействие изучаемых нанотрубок с мембраной эритроцитов. Увеличение микровязкости мембран в присутствии УНТ-H3 для зонда **1** на первичном этапе контакта (инкубация 4 ч) объясняется меньшим размером одностенных нанотрубок, по сравнению с образцами многостенного типа. Меньший размер УНТ-H3 позволяет им за сравнительно небольшое время проникнуть внутрь мембраны. В некоторых случаях отмечена тенденция к снижению микровязкости мембран в начальный период контакта УНТ с мембранами (инкубация 4 ч), как и в случае с зондом **2**.

По активности воздействовать на мембраны эритроцитов, т. е. увеличивать их микровязкость, изучаемые нанотрубки можно расположить в ряд:

$$\text{УНТ-K2} > \text{УНТ-K1} > \text{УНТ-H2} > \text{УНТ-H1} > \text{УНТ-H3}.$$

Таким образом, с помощью липофильных спиновых зондов на основе пальмитиновой кислоты, встраивающихся в липидный бислой мембран эритроцитов, изучено влияние УНТ различной структуры на микровязкость мембран. Изменение микровязкости мембран в присутствии УНТ происходит в два этапа и зависит от времени инкубации нанотрубок с эритроцитами. Начальный этап контакта изучаемых нанотрубок с мембранами (инкубация в те-

чение 4 ч) сопровождается некоторым уменьшением их микровязкости, вследствие деструктуризации поверхностного слоя мембран под действием УНТ. При более глубоком проникновении и задержке УНТ внутри мембран (инкубация в течение суток) практически во всех случаях наблюдалось значительное увеличение (в 1,5–2 раза) микровязкости мембран эритроцитов. Это, по-видимому, может быть одной из причин цитотоксического действия УНТ на клетки, поскольку к параметру вязкости весьма чувствительны ферментативная активность мембранных белков, состояние ионных каналов, проницаемость мембран к продуктам метаболизма, скорость передачи нервных импульсов и др.

Способность УНТ воздействовать на микровязкость мембран эритроцитов зависит от размера нанотрубок и их химии поверхности. Наибольший эффект оказывают гидрофильные (окисленные) многостенные нанотрубки (УНТ-К2). Далее идут гидрофобные многостенные трубки (УНТ-К1 и УНТ-Н1), затем фрагментированные многослойные наночастицы (УНТ-Н2). Наиболее слабое воздействие оказывают сравнительно небольшого размера одностенные нанотрубки УНТ-Н3.

Нами экспериментально продемонстрирована чрезвычайно высокая чувствительность метода спиновых зондов — стабильных липофильных нитроксильных радикалов для оценки воздействия нанообъектов (углеродных нанотрубок) на состояние мембран клеток.

1. Porter A. E., Gass M., Muller K. et al. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells // *Nature Nanotechnol.* – 2007. – **2**, No 11. – P. 713–717.
2. Liu Z., Chen K., Davis C. et al. Drug delivery with carbon nanotubes for *in vivo* cancer treatment // *Cancer Res.* – 2008. – **68**, No 16. – P. 6652–6660.
3. Liu Z., Fan A. C., Rakhra K. et al. Supramolecular stacking of doxorubicin on carbon nanotubes for *in vivo* cancer therapy // *Angew. Chem.* – 2009. – **41**, No 48. – P. 7668–7672.
4. Лизтеништейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – Москва: Наука, 1974. – 256 с.
5. Метод спиновых меток. Теория и применения / Под ред. Л. Берлинера. – Москва: Мир, 1979. – 639 с.
6. Кармель Н. Т., Грищенко В. И., Черных В. П. и др. Использование метода спиновых зондов для оценки цитотоксичности углеродных нанотрубок // *Доп. НАН України.* – 2009. – № 8. – С. 127–133.
7. Иванов Л. В., Кармель Н. Т. Оценка микровязкости клеточных мембран различной природы методом спиновых зондов // *Там само.* – 2012. – № 5. – С. 139–145.
8. Розанцев Э. Г. Свободные иминоксильные радикалы. – Москва: Химия, 1970. – 216 с.
9. Bulusheva L. G., Okotrub A. V., Lavskaya Yu. V. et al. Comparative NEXAFS examination of single-wall carbon nanotubes produced by different methods // *Phys. Status Solidi B.* – 2009. – **246**, No 11./12. – P. 2637–2640.
10. Novopashin S. A., Serebryakova M. A., Sokolov R. E. et al. Heat conductivity of a nanoliquid based on water and chemically modified single walled carbon nanotubes // *Nanotechnol. in Russia.* – 2013. – **8**, No 1./2. – P. 64–68.
11. Bulusheva L. G., Okotrub A. V., Asanov I. P. et al. Comparative study on the electronic structure of arc-discharge and catalytic carbon nanotubes // *Phys. Chem. B.* – 2001. – **105**, No 21. – P. 4853–4859.

Институт химии поверхности им. А. А. Чуйко
НАН Украины, Киев

Институт монокристаллов НАН Украины, Харьков
Институт неорганической химии СО РАН, Новосибирск
Новосибирский государственный университет
Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков

Поступило в редакцию 16.10.2014

Академік НАН України М. Т. Картель, Л. В. Іванов, О. М. Ляпунов,
О. А. Нардід, А. В. Окотруб, І. А. Кирилюк, Я. О. Черкашина

Оцінка впливу вуглецевих нанотрубок на мікров'язкість мембран еритроцитів методом спінових зондів

З використанням методу спінових зондів проведено оцінку мікров'язкості мембран еритроцитів у присутності вуглецевих нанотрубок (ВНТ) різної структури протягом короткого (4 год) і тривалого (24 год) періодів інкубації. За даними спектрів електронного парамагнітного резонансу ліпофільних іміноксильних радикалів визначено час кореляції обертальної дифузії зондів у мембрані, пропорційний в'язкості їх ліпідного шару. При тривалій інкубації для всіх нанотрубок характерна здатність до збільшення мікров'язкості мембран еритроцитів в 1,5–2 рази. Здатність ВНТ впливати на мікров'язкість мембран еритроцитів залежить від розміру трубок та їх хімії поверхні. Найбільший ефект дають гідрофільні (окиснені) багатостінні нанотрубки. Менший вплив спостерігається від гідрофобних багатостінних трубок та їх фрагментів, а одностінні нанотрубки характеризуються найслабшим впливом на мембрани еритроцитів серед дослідженого ряду ВНТ.

Academician of the NAS of Ukraine M. T. Kartel, L. V. Ivanov, O. M. Lyapunov,
O. A. Nardid, A. V. Okotrub, I. A. Kirilyuk, Ya. O. Cherkashina

Estimation of the effect of carbon nanotubes on the microviscosity of erythrocyte membranes by the spin probe method

Using the method of spin probes, we have evaluated the microviscosity of erythrocyte membranes in the presence of carbon nanotubes of different structures for short (4 h) and long (24 h) incubation periods. According to the EPR spectra of lipophilic iminoxyl radicals, the correlation time of rotational diffusion probes in membranes is determined to be proportional to the viscosity of the lipid layer. Upon the prolonged incubation, all nanotubes are characterized by the ability to increase the microviscosity of erythrocyte membranes by 1.5–2 times. The ability of carbon nanotubes to affect the erythrocyte membrane microviscosity depends on the tube size and the chemistry of surfaces. The greatest effect belongs to hydrophilic (oxidized) multiwalled nanotubes. There is a less impact from the hydrophobic multiwalled tubes and their fragments, and the single-walled nanotubes are characterized by the weakest effect on erythrocyte membranes among the investigated series of carbon nanoparticles.