

УДК 546.26:615.099.092

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК С ЛИПОСОМАМИ МЕТОДОМ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ

Л.В. Иванов¹, Н.Т. Картель¹, О.А. Нардид²

¹Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина

²Институт криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины
ул. Переяславская, 23, Харьков, 61015, Украина

С использованием метода спиновых зондов проведено детектирование взаимодействия углеродных нанотрубок с липосомальными мембранами фосфатидилхолинового типа, а также с эритроцитами человека. Установлено, что введение нанотрубок во взвесь липосом приводит к вытеснению липофильных спин-меченых стероидов из липидов мембран. Белковые компоненты мембран эритроцитов повышают их вязкость (уровень иммобилизации стероидов) и снижают эффективность вытеснения спиновых меток из мембран.

Введение

В настоящее время имеется большое количество данных, свидетельствующих о взаимодействии углеродных нанотрубок (УНТ) различного строения и размера со структурами биологических клеток, что обуславливает уровень их токсичности. Установлено, что УНТ способны преодолевать как внешние мембраны клеток, так и мембраны внутриклеточных органелл (митохондрий, ядер), что может приводить в конечном итоге к гибели клеток. Предполагается, что диффузия УНТ в мембранах осуществляется в фосфолипидном бислое [1–5].

Нами с помощью метода спиновых зондов [6] было показано, что взаимодействие многостенных УНТ с эритроцитами крови человека через несколько часов приводит к нарушению целостности последних – появлению в мембранах каналов доступа для ионов электролита, обычно не проникающих через нормально функционирующую мембрану. Взаимодействие УНТ с гомогенатами ряда органов экспериментальных животных (крыс) приводило к заметному падению митохондриальной активности соответствующих клеток тканей, вследствие, по-видимому, шунтирования цепи переноса электронов в митохондриях (клеточное дыхание) нанотрубками, обладающими хорошей электропроводностью и способностью хемосорбировать молекулярный кислород [7, 8].

Было бы естественным утверждать, что токсическое воздействие нанотрубок на различные клетки, а также ткани и органы в целом предполагает первичное непосредственное взаимодействие УНТ с клеточной мембраной. Однако работ, изучающих сам факт и характер взаимодействия УНТ с мембранами различных клеток, крайне мало из-за недостаточности тонких и адекватных биофизических методов, способных детектировать средство нанотрубок к липидам или белкам мембран клеток.

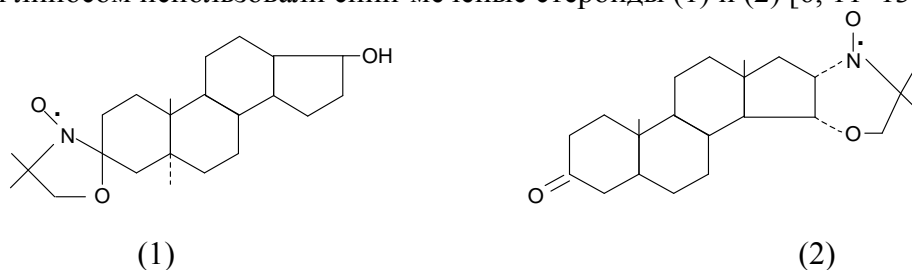
Целью работы явилось изучение с помощью метода спиновых зондов средства УНТ к мембранам липосом из фосфатидилхолина. Выбранный нами метод детектирования взаимодействия УНТ с мембранами липосом позволяет оценивать такое взаимодействие по вытеснению нанотрубками липофильных спиновых зондов (меченых

стероидов) из липидного слоя мембран липосом во внешнюю водную среду в результате связывания липофильных нанотрубок с мембраной. При этом форма и параметры спектров ЭПР липофильных спиновых зондов, вытесненных из липосом, должны заметно измениться [6].

Материалы и методы

В работе использовали высокочистые многостенные УНТ, полученные на пилотной установке, разработанной Институтом химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины совместно с предприятием «ТМспецмаш» (Киев), путем каталитического пиролиза непредельных углеводородов [9]. Внутренний диаметр нанотрубок составляет 1–2 нм, внешний 10–40 нм, зольность – менее 0,4%, содержание нанотрубок – более 95%. Стабильную взвесь липофильных УНТ в воде готовили в соответствии с методикой, описанной в [7].

Липосомы получали путем ультразвуковой обработки многослойных везикул из фосфатидилхолина с концентрацией 0,05% на частоте 22 кГц в буферном растворе 0,1 М ТРИС с pH 7,2 согласно методике, описанной в [10]. Эритроциты крови человека получали согласно методике, описанной в [7]. Для детектирования сродства УНТ к мембранам липосом использовали спин-меченые стероиды (1) и (2) [6, 11–13]:



Результаты и их обсуждение

Спектры ЭПР спин-меченого стероида (1) в липосомах до и после введения УНТ в суспензию липосом в концентрации 100 мкг/мл, представлены на рис. 1, из которого видно, что спектр ЭПР липофильной спиновой метки в липосомах представляет суперпозицию широкого сигнала, соответствующего зонду, находящемуся в вязкой среде липидов мембраны, и узкого сигнала, соответствующего быстрой вращательной диффузии зонда в водной внеклеточной среде. Введение УНТ в суспензию липосом привело к заметным изменениям в спектре ЭПР: широкий сигнал, ответственный за зонд в липидах мембран липосом, практически исчез и остался только узкий сигнал, интенсивность которого увеличилась более чем в 10 раз. Поэтому для сравнения формы двух спектров на приборе уменьшили интенсивность второго спектра ЭПР к значениям близким к контролю. Изменения формы спектра ЭПР свидетельствуют об эффективном вытеснении спин-меченого стероида нанотрубками из мембраны липосом в водную среду в результате связывания липофильных нанотрубок с поверхностью мембран.

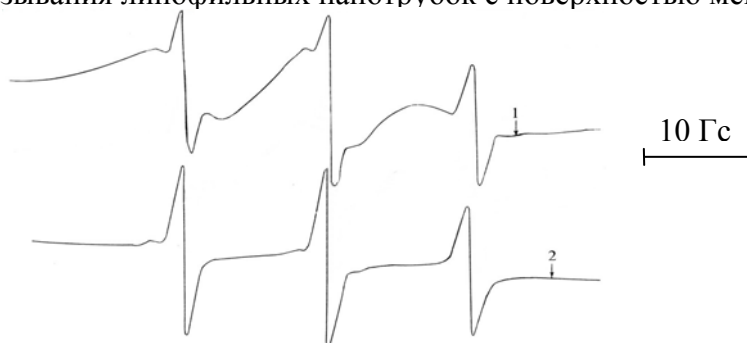


Рис. 1. Влияние УНТ на спектры ЭПР спин меченого стероида (1) в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М в липосомах: 1 – спектр спин меченого стероида (1) в липосомах (контроль), 2 – спектр после контакта липосом с суспензией УНТ (100 мкг/мл).

Аналогичные результаты наблюдаются при введении УНТ в суспензию липосом, содержащих липофильный зонд (2) (рис. 2). Спектр ЭПР зонда (2) в липосомах так же, как и в случае зонда (1), представляет суперпозицию широкого и узкого сигналов ЭПР, а введение УНТ в концентрации 50 мкг/мл приводит к вытеснению зонда из мембраны липосом в водную среду.

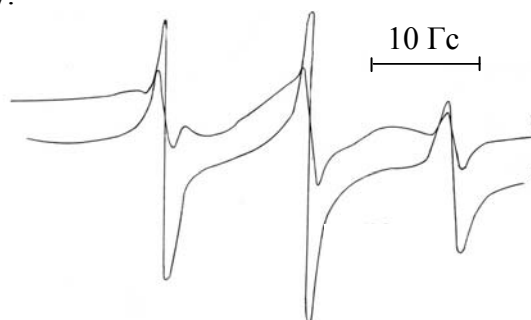


Рис. 2. Влияние УНТ на спектры ЭПР спин меченого стероида (2) в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М в липосомах: 1 – спектр спин меченого стероида (2) в липосомах (контроль), 2 – спектр после контакта липосом с суспензией УНТ (50 мкг/мл).

Учитывая, что фосфатидилхолин является основным липидным компонентом, входящим в состав мембран различных клеток и клеток тканей, можно сделать вывод о том, что УНТ могут эффективно связываться с липидами мембран клеток и способны вытеснять из мембран биологически активные вещества, связанные с липидами гидрофобными связями. Поэтому воздействие УНТ на мембраны различных клеток может не только выражаться в виде структурных изменений в мембранах, но и влиять на протекание определенных биохимических процессов в самих мембранах.

Для выявления характера взаимодействия УНТ с мембранами интересно рассмотреть не только модельные клетки (липосомы), но и реальные клетки, например эритроциты крови человека с введенным спиновым зондом (2). Соответствующие спектры ЭПР приведены на рис. 3, из которых видно, что контрольный спектр зонда (2) в мембране эритроцитов характеризуется очень медленной вращательной диффузией зонда (время релаксации вращательной диффузии τ_c составляет около 10^{-8} с). Незначительная узкая компонента спектра в низкополевой части триплетта свидетельствует о небольшом количестве свободного зонда (2) в водной среде.

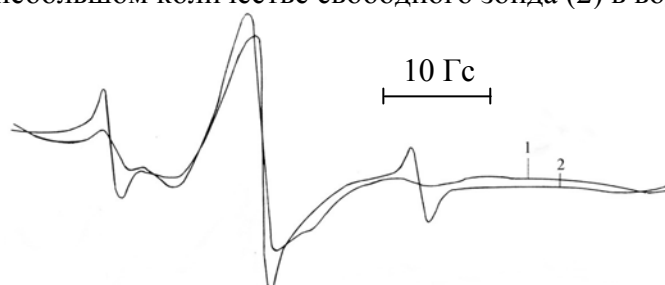


Рис. 3. Влияние УНТ на спектры ЭПР спин меченого стероида (2) в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М в суспензии эритроцитов: 1 – спектр спин меченого стероида (2) в эритроцитах (контроль), 2 – спектр после контакта эритроцитов с суспензией УНТ (50 мкг/мл).

Чрезвычайно низкая подвижность зонда (2) в мембранах эритроцитов (иммобилизация зонда) объясняется наличием сравнительно большого содержания в мембранах протеинов, в частности спектрина, по сравнению с липосомами, где протеины полностью отсутствуют [6, 11, 12]. Поэтому следует учитывать дополнительное гидрофобное взаимодействие липофильного зонда (2) с гидрофобными

областями поверхностных мембранных белков. Добавление УНТ во взвесь эритроцитов приводит к увеличению интенсивности узкого сигнала в низкочастотной компоненте триплета спектра ЭПР приблизительно в 2 раза и появлению узкого сигнала в высокочастотной компоненте спектра, что свидетельствует о вытеснении некоторой части зонда (2) из мембраны эритроцитов в водную среду нанотрубками в процессе их связывания с мембраной.

Сравнительный анализ изменений в спектрах ЭПР меченых стероидов в мембранах липосом и эритроцитов под действием УНТ показал, что взаимодействие УНТ с липосомами более эффективно. Это понятно, поскольку мембрана липосом состоит из чистого фосфолипида, а мембрана эритроцитов, кроме липидной части, содержит достаточно большое количество белков. Из полученных данных следует также, что эффективность взаимодействия УНТ с мембранами (а значит и цитотоксичность УНТ) существенно зависит от вязкости липидной части мембран, от ее содержания в мембране и размеров липидных доменов, через которые осуществляется диффузия нанотрубок. Таким образом, проницаемости мембран липосом и эритроцитов резко отличаются и могут рассматриваться в качестве крайних случаев в ряду их реологических характеристик.

Выводы

Методом спиновых зондов проведено детектирование взаимодействия многостенных УНТ с фосфатидилхолиновыми липосомами и эритроцитами человека. Показано, что введение УНТ во взвесь липосом в концентрациях 50–100 мкг/мл приводит к вытеснению липофильных спин-меченых стероидов из липидов мембран липосом в водную среду вследствие взаимодействия нанотрубок с липидами мембран. Аналогичный эффект наблюдается и в случае взаимодействия спин меченого стероида с мембраной эритроцитов.

Установлено, что способность УНТ вытеснять липофильные спин-меченые стероиды проявляется в большей степени в мембранах липосом, состоящих только из фосфолипидов, по сравнению с мембранами эритроцитов, содержащими значительную долю белковых компонент и имеющими благодаря этому более высокую вязкость (меньшую проницаемость).

Литература.

1. Zhao Y., Xing G., Chai Z. Nanotoxicology: Are carbon nanotubes safe? // *Nature Nanotechnology*. – 2008. – V. 3, N. 4. – P. 191–192. (<http://nature.com/nnano/journal/v3/n4/full/nnano.2008.77.htm>).
2. Lu F.S., Gu L.R., Meziani M.J. et al. Advances in bioapplications of carbon nanotubes // *Advanced Materials*. – 2009. – V. 21, N. 2. – P. 139–152. (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adma.200801491/abstract>).
3. Schipper M.L., Nakayama-Ratchford N., Davis C.R. et al. A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice // *Nature Nanotechnology*. – 2008. – V. 3, N. 4. – P. 216–221. (<http://nature.com/nnano/journal/v3/n4/full/nnano.2008.68.html>).
4. Srinivasan C.. Toxicity of carbon nanotubes - Some recent studies // *Current Science*. – 2008. – V. 95, N. 3. – P. 307.
5. Porter A.E., Gass M., Muller et K.al. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells // *Nature Nanotechnology*. – 2007. – V. 2, N. 11. – P. 713–717. (<http://nature.com/nnano/journal/v2/n11/full/nnano.2007.347.html>).
6. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 256 с.
7. Kartel M.T., Chernykh V.P., Ivanov L.V. et al. Mechanisms of the cytotoxicity of carbon nanotubes // *Chemistry, Physics and Technology of Surface*. – 2011. – V. 2, N. 2. – P. 182–189. (<http://cpts-com-ua.1gb.ua/images/stories/pdf/2/2.2/kartel.pdf>).

8. Kartel M.T., Ivanov L.V., Kovalenko S.N., Tereschenko V.P. Carbon nanotubes: Biorisks and biodefence // Biodefence. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology / Eds. S. Mikhailovsky and A. Khajibaev. – Springer Science + Business Media B.V., 2011. – P. 11–22. (<http://twirpx.com/file/839393/>).
9. Семенцов Ю.И., Мележик А.В., Приходько Г.П. и др. Синтез, структура, физико-химические свойства наноуглеродных материалов // Физикохимия наноматериалов и супрамолекулярных структур / Под ред. А.П. Шпака и П.П. Горбика. – Киев: Наукова думка, 2007. – Т. 2. – С. 116–158.
10. Липосомы в биологических системах / Под ред. Г. Грегориадиса и А. Аллисона. – М.: Медицина, 1983. – 384 с.
11. Кольтовер В.К. Спиновые метки и зонды в исследованиях модельных и биологических мембран // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биофизика. – 1979. – Т. 2. – С. 10–100.
12. Жданов Р.И. Парамагнитные модели биологически активных соединений. – М.: Наука, 1981. – 280 с.
13. 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.

ДЕТЕКТУВАННЯ ВЗАЄМОДІЇ ВУГЛЕЦЕВИХ НАНОТРУБОК З ЛІПОСОМАМИ МЕТОДОМ СПІНОВИХ ЗОНДІВ

Л.В. Іванов¹, М.Т. Картель¹, О.А. Нардід²

¹*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна;*

²*Інститут кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України,
вул. Переяславська, 23, Харків, 61015, Україна*

З використанням методу спінових зондів проведено детектування взаємодії вуглецевих нанотрубок з ліпосомальними мембранами фосфатидилхолінового типу, а також з еритроцитами людини. Встановлено, що введення нанотрубок до суспензії ліпосом призводить до витіснення ліпофільних спин мічених стероїдів з ліпідів мембран. Білкові компоненти мембран еритроцитів підвищують їх в'язкість (рівень іммобілізації стероїдів) та знижують ефективність витіснення спінових зондів з мембран.

DETECTION OF THE INTERACTION OF CARBON NANOTUBES WITH LIPOSOME'S BY METHOD OF SPIN PROBES

L.V. Ivanov¹, M.T. Kartel¹, O.A. Nardid²

¹*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine,
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine;*

²*Institute of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine,
23 Pereyaslavska Str., Kharkiv, 61015, Ukraine*

Using the method of spin probes it is carried out a detection of carbon nanotubes interaction with liposomal membranes of phosphatidylcholine type, as well as human red blood cells. It is established that the introduction of nanotubes into the suspension of liposomes leads to a displacement of lipophilic spin labeled steroids from lipid membranes. Protein components of erythrocyte membranes increase their strength (the level of immobilization of steroids) and reduce the efficiency of the removal of the spin label from the membranes.