

О. В. Ременяк, С. В. Прилуцька, А. В. Бичко, Ю. І. Прилуцький,  
В. К. Рибальченко

## Мембранотропна дія вуглецевих нанотрубок

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костерінім)

*З використанням спектроскопічних методів (ВИД-ІЧ та КРС) та методу нестационарних вольт-амперних характеристик досліджені процеси агрегації вуглецевих нанотрубок у воді та їх вплив на електричні характеристики бімолекулярних ліпідних мембран. Встановлено, що стан агрегації вуглецевих нанотрубок залежить від їх концентрації у воді. Показано, що вуглецеві нанотрубки адсорбуються на поверхні мембрани та ініціюють появу крайових дефектів у структурі ліпідного бішару.*

Вуглецеві нанотрубки (ВНТ) мають унікальні фізико-хімічні властивості [1, 2], зокрема високу міцність, електричну провідність, адсорбційну активність, термостабільність. Залежно від симетрії ВНТ набувають властивостей металів або напівпровідників. Їм притаманна біологічна активність як *in vitro*, так і *in vivo*. Зокрема, їх використовують як матеріали для біокатализаторів та біосенсорів [3]. ВНТ здатні блокувати іонні канали [4] та проникати крізь плазматичну мембрану [5] і, таким чином, бути носіями лікарських препаратів. ВНТ відрізняються за токсичною дією на клітини, яка істотно залежить від типу ВНТ (одно- чи багатостінні), їх довжини, функціоналізації і, нарешті, від їх концентрації [6]. Однак вивчення біологічних ефектів ВНТ обмежене через їх значну гідрофобність, що ускладнює взаємодію ВНТ з біологічними системами. Тому для поліпшення їх розчинності використовують різноманітні хімічні методи. Одним з них, наприклад, є метод окислення ВНТ різними кислотами, у результаті чого утворюються ВНТ з карбонільними та карбоксильними групами на кінцях та на їх стінках [7]. Розчинність ВНТ у воді підвищується після приєднання до них вуглеводів [8], що приводить до утворення їх кон'югатів "ВНТ-вуглевод", які можуть зв'язуватися з різними патогенами, прикладом чого є зв'язування галактозилізованих ВНТ з *E. coli* [9, с. 244]. У зв'язку з цим актуальним є дослідження розчинності ВНТ, їх цитотоксичності, мембранотропної дії та біоактивності.

Мета дослідження полягала у вивченні структурної організації ВНТ у водній суспензії та їх впливу на електричні характеристики бімолекулярних ліпідних мембран (БЛМ).

**Матеріали і методи.** Високоочищені ВНТ отримували методом піролізу пульверизованого шару (бензол + 1% фероцену в струмені аргону при 900 °С) при хімічному осадженні з парової (газової) фази [10]. На рис. 1 наведено електронно-мікроскопічне зображення одностінних ВНТ (ОВНТ) з діаметром 1–2 нм. Діаметр багатостінних ВНТ (БВНТ) становив 20–40 нм. Довжина ВНТ варіювала в межах 1–4 мкм.

Розчинність ВНТ у воді досягалася завдяки їх окисленню азотною кислотою протягом 2 год при 100 °С, у результаті чого на кінцях ВНТ утворюються карбоксильні групи (–COOH) [7] (рис. 2).

100 мг функціоналізованих шляхом окислення ВНТ (ВНТ – COOH) розмішували у 50 мл води під дією струменя аргону протягом 48 год [7]. Таке розмішування забезпечувало частковий перехід ВНТ у водний розчин. Отриману суміш фільтрували через

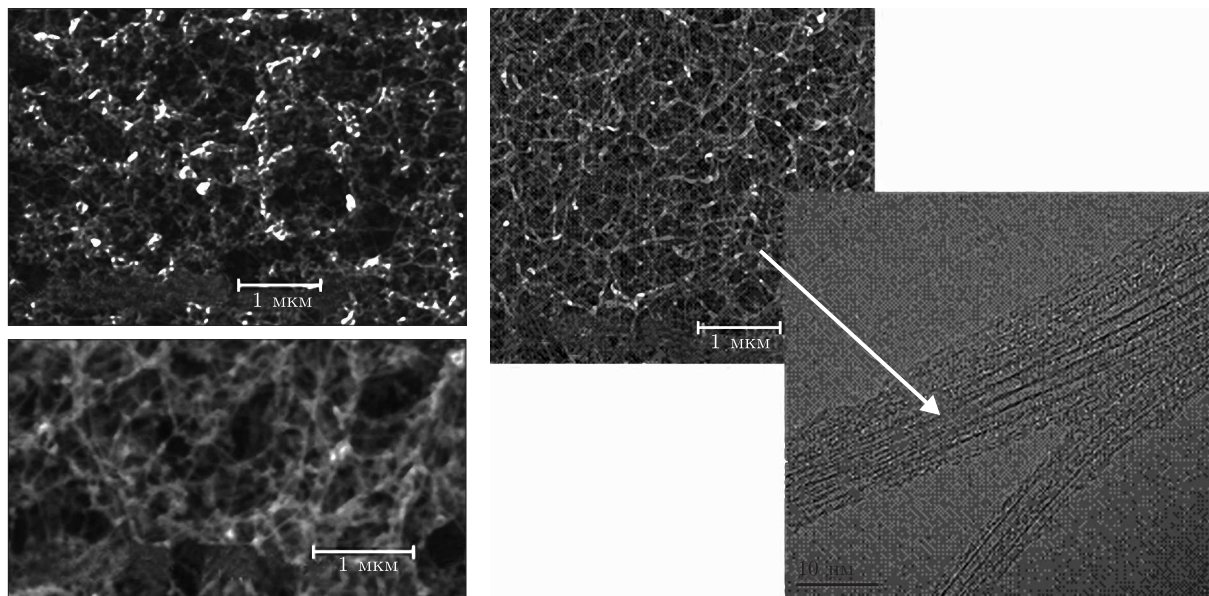


Рис. 1. Електронно-мікроскопічне зображення ОВНТ, отриманих методом дугового розпилення графітових електродів

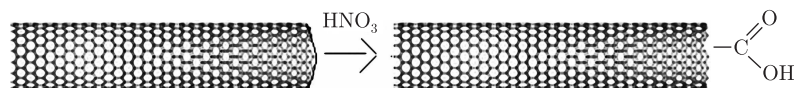


Рис. 2. Модель ОВНТ, на одному з кінців якої внаслідок обробки азотною кислотою утворюється карбоксильна група

мембрану (розмір пори 1,2 мкм), на якій збиралися ВНТ. Фільтрат мав коричневий колір і містив у тому числі малу кількість коротких ВНТ. Максимальне значення концентрації отриманих функціоналізованих ОВНТ у воді становило 0,1 мг/мл, а БВНТ — 0,5 мг/мл.

БЛМ формували за методом Мюллера [11] на отворі діаметром 0,32 мм у тefлоновій склянці з розчину азоексину (24 мг/мл в *n*-декані) за умов симетричного оточення мембрани розчином електроліту (100 мМ КСІ). Електричні характеристики БЛМ вимірювали методом нестационарних вольт-амперних характеристик (ЦВАХ) [12]. Вхідний сигнал трикутної форми, 0,01 Гц і  $\pm 50$  мВ, подавався на БЛМ з генератора Г6-15. Внутрішній опір операційного підсилювача (режим ІІ-конвертор) становив  $10^{-10}$  Ом. Отримані дані наведені у вигляді відносних змін провідності  $G/G_0$  та електричної ємності  $C/C_0$ , де  $G_0$  і  $C_0$  — параметри не модифікованої досліджуваною речовиною БЛМ (контроль). Концентраційну залежність електричних характеристик БЛМ досліджували в діапазоні концентрацій ВНТ  $0,5 \cdot 10^{-3}$  — 0,5 мг/мл.

Вимірювання спектрів поглинання у видимій та інфрачервоній ділянках (ВИД-ІЧ) проводили на спектрофотометрі “Scinco” (Німеччина) у діапазоні довжин хвиль 400–1100 нм при кімнатній температурі.

Спектри комбінаційного розсіювання світла (КРС) реєстрували за допомогою мікроман спектрографа NovaLab 5000R з лазерним збудженням на довжині хвилі 785 нм. Калібрування хвильового числа проводили, використовуюючи  $521 \text{ см}^{-1}$  лінію кремнію. Краплину (10 мкл) розчинених ВНТ розміщували на кремнієвій підкладці, і лазер фокусували на

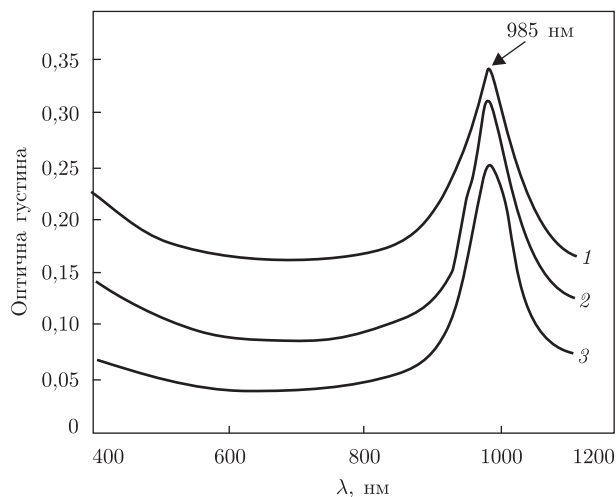


Рис. 3. Спектри оптичного поглинання ОВНТ у воді за різної концентрації: 1 — 0,1 мг/мл; 2 — 0,033 мг/мл; 3 — 0,01 мг/мл

цьому місці, використовуючи 50-кратну збільшувальну лінзу та лазер потужністю 10 мВт. Вимірювання КРС спектрів проводили в області хвильових чисел від 500 до 2000  $\text{см}^{-1}$  при кімнатній температурі протягом 4 хв.

**Результати та їх обговорення.** ВИД-ІЧ спектроскопію використовували для характеристики розчинності у воді ВНТ, оскільки спектри поглинання диспергованих ВНТ чутливі до їх стану агрегації (зі зростанням концентрації ВНТ у розчині вони здатні утворювати в'язки з нанотрубок) [7]. Спектри поглинання розчинених у воді ОВНТ за різних концентрацій зображені на рис. 3. Початок поглинання спостерігали вже на довжині хвилі  $\lambda \sim 1100$  нм. Цей факт свідчить про те, що оптичні електрони, які відповідають за поглинання, не делокалізовані вздовж усієї довжини ОВНТ. Аналіз отриманих спектрів показує, що довгохвильовий максимум поглинання при  $\lambda = 985$  нм належить до першого електронного переходу, при  $\lambda < 600$  нм — до наступних електронних переходів. Зі зниженням концентрації ОВНТ у воді інтенсивність поглинання зменшується. Отже, дослідження залежності оптичної густини від концентрації ОВНТ у водному розчині показують, що у цьому випадку закон Бугера-Ламберта-Бера не виконується, тобто ОВНТ вздовж усієї довжини неоднорідно поглинають світло. Це, на нашу думку, може бути пов'язано саме з агрегацією ОВНТ у воді.

Необхідно відзначити, що подібний якісний характер має ВИД-ІЧ спектр і для водної суспензії БВНТ з максимумом поглинання при  $\lambda = 985$  нм.

Для подальшого дослідження стану агрегації розчинених ВНТ ми використали КРС спектроскопію. Як відомо, фундаментальними коливними модами БВНТ, які характеризують їх присутність у будь-якій речовині, є високочастотні моди при хвильових числах  $1355 \text{ см}^{-1}$  (D-мода) і  $1594 \text{ см}^{-1}$  (G-мода) [13]. З отриманого КРС спектра (рис. 4) видно, що ці моди є надзвичайно чутливими до розчинності БВНТ: вони уширюються та зміщуються в бік високих частот. Зі зниженням концентрації БВНТ у воді значення інтенсивності цих піків зменшується, що також, на наш погляд, є наслідком їх агрегації.

При модифікації досліджуваними речовинами у всьому діапазоні концентрацій спостерігали незначні зміни електричних характеристик БЛМ:  $G_0 = 4,23 \pm 0,21 \text{ мСм/м}^2$ ,  $C_0 = 6,7 \pm 0,2 \text{ мФ/м}^2$ . Однак модифікація БЛМ препаратом БВНТ призводила до виникнення

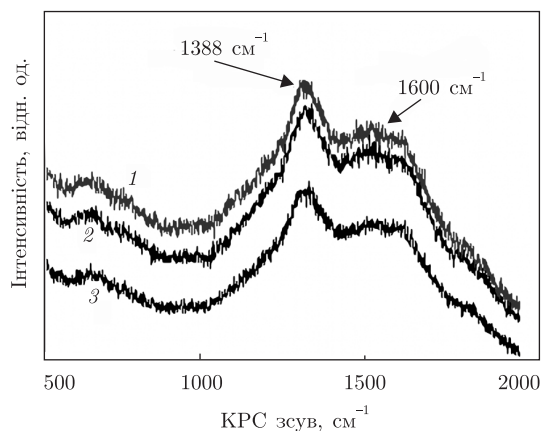


Рис. 4. КРС спектри БВНТ у воді за різної концентрації: 1 — 0,5 мг/мл; 2 — 0,166 мг/мл; 3 — 0,05 мг/мл

стохастичних стрибків провідності величиною в середньому 27,2 пСм зі зростанням їх концентрації на  $0,5 \cdot 10^{-2}$ ,  $0,5 \cdot 10^{-1}$  та 0,5 мг/мл. Для препарату ОВНТ аналогічна ситуація спостерігається за концентрацій  $0,1 \cdot 10^{-1}$  та 0,1 мг/мл.

Отримані результати, на нашу думку, можна інтерпретувати таким чином. Досліджувані наноматеріали, як ОВНТ, так і БВНТ, адсорбуючись на поверхні ліпідного бішару, ініціюють появу короткоіснуючих крайових дефектів структури мембрани в зоні контакту. Ці дефекти структури не впливають на загальну іонну провідність мембрани, але обумовлюють появу стохастичної електричної провідності і можуть відображати можливі локальні фазові перебудови ліпідів у зоні контакту. Крім того, локальне збільшення провідності БЛМ за присутності БВНТ у більш широких концентраційних межах у порівнянні з ОВНТ може бути пов'язано з агрегацією цих наноматеріалів у воді, тобто з їх відносними розмірами, що збільшує площу зони контакту та питому кількість дефектів у структурі БЛМ.

Таким чином, згідно з отриманими результатами, при контакті з мембраною досліджувані ВНТ адсорбуються на її поверхні та ініціюють появу крайових дефектів у структурі ліпідного бішару. Останні мають більшу електричну провідність у порівнянні з мембраною і здатні сприяти проникненню ВНТ у ліпідний бішар внаслідок пасивної дифузії. Це означає, що лікарські препарати, антигени і гени, які включені всередину ВНТ, можуть цілеспрямовано транспортуватися до біологічних мішеней.

З використанням методів ВИД-ІЧ та КРС спектроскопії досліджені стани агрегації ВНТ залежно від їх концентрації у воді. Це має практичне значення при вивченні концентраційного ефекту цитотоксичності ВНТ.

Показано, що ВНТ інтенсивно поглинають у ближній ІЧ ділянці спектра ( $\lambda = 985$  нм). Для біологічних об'єктів можна запропонувати використовувати цей спектральний інтервал для оптичного стимулювання введених всередину ракових клітин ВНТ. У цьому випадку ІЧ опромінення може приводити до руйнування ракових пухлин у результаті локального розігріву ВНТ (гіпертермії) *in vivo* без ушкодження нормальних клітин.

*Автори щиро вдячні співробітникам хімічної лабораторії Інституту фізики Технічного університету Ілменау (Німеччина) за надані зразки для досліджень.*

1. Dresselhaus M. S., Dresselhaus G., Eklund P. C. Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes. – New York: Acad. Press, 1996. – 985 p.
2. Harris P. J. F. Carbon Nanotubes and Related Structures. – Cambridge: Univ. Press, 1999. – 294 p.

3. Ziegler K. J. Developing implantable optical biosensors // Trends Biotechnol. – 2005. – **23**, No 9. – P. 440–444.
4. Park K. N., Chhowalla M., Iqbal Z., Sesti F. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, No 50. – P. 50212–50216.
5. Ajayan P. M., Zhou O. Z. Drug delivery and biomolecular transport // Carbon. – 2005. – No 3. – P. 389–415.
6. Magrez A., Kasas S., Salicio V. et al. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials // Nano Lett. – 2006. – **6**, No 6. – P. 1121–1125.
7. Prylutska S. V., Grymyuk I. I., Matyshevska O. P. et al. Estimation of multi-walled carbon nanotubes toxicity in vitro // Physica E. – 2008. – **40**, No 7. – P. 2565–2569.
8. Bandyopadhyaya R., Nativ-Roth E., Regev O., Yerushalmi-Rozen R. Stabilization of Individual Carbon Nanotubes in Aqueous Solutions // Nano Lett. – 2002. – **2**. – P. 25–28.
9. Пуотровський Л. Б., Киселев О. И. Фуллерены в биологии. – Санкт-Петербург: Росток, 2007. – 335 с.
10. Katok K. V., Tertykh V. A., Brichka S. Y. et al. Pyrolytic synthesis of carbon nanostructures on Ni, Co, Fe/MCM-41 catalysts // J. Mater. Chem. Physics. – 2006. – **96**, No 2–3. – P. 396–401.
11. Mueller P., Rudin D. O., Tien H. T., Wescott W. C. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution // Nature. – 1962. – **194**. – P. 976.
12. Омельченко А. М., Бовыкин Б. А., Сытник Т. В. Измерение емкости бислойных липидных мембран методом нестационарных циклических вольт-амперных характеристик // Молекуляр. генетика и биофизика. – 1990. – **15**. – С. 17–20.
13. Ritter U., Scharff P., Siegmund C. et al. Radiation damage to multi-walled carbon nanotubes and their Raman vibrational modes // Carbon. – 2006. – **44**, No 13. – P. 2694–2700.

Київський національний університет  
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 27.06.2008

**O. V. Remeniak, S. V. Prylutska, A. V. Bychko, Yu. I. Prylutskyy,  
V. K. Rybalchenko**

### **The membranotropic action of carbon nanotubes**

*The processes of aggregation of carbon nanotubes in water and their influence on the electric parameters of bimolecular lipid membranes are studied with the use of VIS-IR and Raman spectroscopy and the method of non-stationary volt-ampere characteristics. It is established that the aggregation state of carbon nanotubes depends on their concentration in water. It is shown that carbon nanotubes are adsorbed on the membrane surface and initiate the marginal defects in the lipid bilayer structure.*