

Член-корреспондент НАН Украины **Н. Т. Картель, Л. В. Иванов, О. А. Нардид, Я. О. Черкашина, А. В. Козлов, С. В. Репина**

Оценка действия углеродных нанотрубок на митохондриальную активность клеток тканей различных органов методом спиновых зондов

С использованием метода спиновых зондов проведена оценка действия обычных и модифицированных (окисленных) углеродных нанотрубок на митохондриальную активность клеток в гомогенатах тканей печени, почек, сердца и легких экспериментальных животных (крыс). Обсуждены причины избирательного действия нанотрубок (отличия в гидрофильно-липофильном балансе исследованных тканей, отталкивание одноименно заряженных фосфолипидов мембран и окисленных нанотрубок, экранирующее действие сурфактантов на альвеолах легких). Представлены количественные данные о степени токсичности УНТ относительно тканей различных органов. Высказано предположение о том, что направленная химическая модификация нанотрубок может существенно снизить или полностью нивелировать эффекты токсичности углеродных наноматериалов в отношении тканей или органов в целом.

Вопрос о токсичности и, в частности, цитотоксичности углеродных нанотрубок (УНТ) остается открытым, поскольку существует множество противоречивых данных относительно их влияния на различные клетки, ткани органов и живые организмы в целом [1–5]. В настоящее время недостаточно систематических исследований, которые, прежде всего, разграничили бы агрессивность УНТ по отношению к разным структурным элементам изучаемых клеток и воздействие УНТ на функциональную активность клеток либо внутриклеточных органелл. Существенный пробел отмечается в сравнительном исследовании токсичности УНТ относительно различных тканей органов, однако проблема избирательной токсичности УНТ для тканей (органов) и возможных причин такой избирательности практически не обсуждалась.

Следует отметить, что токсичность нанотрубок безусловно зависит от многих факторов. Прежде всего, следует принимать во внимание характеристики самих нанотрубок, получаемых разными способами и различающимися количеством слоев в стенке, размерами, чистотой, степенью дефектности, электропроводностью, химией поверхности и т. д. С другой стороны, тип и структура биологических клеток также определяют биосовместимость и токсичность любого наноматериала. Эти вопросы изучены пока что крайне фрагментарно, вероятно, из-за недостатка чувствительных и надежных биофизических методов, позволяющих адекватно отслеживать изменения в структурных и функциональных параметрах клеток и внутриклеточных органелл.

Впервые высокочувствительный метод спиновых зондов для изучения цитотоксичности углеродных нанотрубок использовался нами в экспериментах, описанных в статьях [6, 7]. В ходе исследований отмечалась прямая зависимость агрессивного действия на мембрану эритроцитов и мембрану митохондрий гепатоцитов от концентрации УНТ в суспензии.

Цель данной работы — оценить воздействие обычных и модифицированных (окисленных) УНТ на митохондриальную активность клеток тканей печени, почек, сердца и лег-

ких экспериментальных животных (крыс) и выявить причины “избирательности” такого воздействия, используя метод спиновых зондов. Нам представляется, что результаты исследования могут стать основой первичной тестовой оценки токсичности УНТ различного приготовления, а также, вероятно, иных углеродных и неорганических наноматериалов.

Материалы и методы исследований. В процессе работы использовались многослойные УНТ высокой чистоты, полученные на пилотной установке Института химии поверхности им. А. А. Чуйко НАН Украины путем каталитического пиролиза непредельных углеводородов [8]. Синтезированный и рафинированный продукт представляет собою агломераты нанотрубок преимущественно в виде нанонитей. Содержание аморфного и других видов углерода не превышает 5%, зольность — менее 0,5%. Внутренний диаметр нанотрубок составляет 1–2 нм, внешний — 10–60 нм. Технические характеристики продукта регламентированы техническими условиями (ТУ У 24.1-03291669-009:2008). Модифицированный вариант нанотрубок получен в результате их дополнительной обработки раствором азотной кислоты, в результате чего суммарная концентрация кислородсодержащих (фенольных, лактонных и карбоксильных) групп на поверхности нанотрубок составила 1,5 ммоль/г.

Гомогенаты печени, почек, сердца и легких крыс готовили путем измельчения соответствующих тканей с помощью гомогенизатора MPW-302 (Польша) с последующим дифференциальным центрифугированием, согласно методике, описанной в статьях [6, 9]. Период инкубации гомогенатов тканей с суспензией нанотрубок составлял 2 ч при комнатной температуре. Использование гомогенатов позволяет отбирать точные количества тканевого материала в специальные стеклянные капилляры, помещаемые в резонатор радиоспектрометра (“BRUKER”, Германия) для измерений спектров электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В качестве парамагнитного зонда использовали водорастворимый иминоксильный радикал: 2,2,6,6-тетраметил-4-гидроксипиперидин-1-оксил (ТЕМРОН). Для того чтобы получить стабильную суспензию УНТ, ее обрабатывали ультразвуком, замораживали и после размораживания центрифугировали при скорости 10000 об/мин [6, 7].

Для оценки митохондриальной активности образцов различных тканей нами использовалась модификация метода спиновых зондов, в котором по скорости восстановления иминоксильных радикалов, введенных в гомогенат ткани (суспензию клеток, имеющих митохондрии), можно судить об активности цепи переноса электронов (дыхательная цепь митохондрий). Восстановление спинового зонда до непарамагнитного гидроксиламина осуществляется сильным антиоксидантом — коэнзимом Q₁₀ дыхательной цепи митохондрий. При этом интенсивность спектра ЭПР экспоненциально снижается во времени. Логарифмируя такие кривые, получаем прямые, тангенс угла наклона которых к оси абсцисс пропорционален скорости восстановления зонда, что позволяет количественно оценить митохондриальную активность клеток тканей различных органов [6, 9].

Результаты и их обсуждение. Данные кинетики восстановления спинового зонда в гомогенате ткани почек крыс в присутствии обычных и окисленных нанотрубок демонстрирует рис. 1, а, откуда видно, что скорости восстановления зонда в образцах этой ткани (митохондриальная активность) в контроле и в присутствии нанотрубок заметно различаются. Обычные УНТ провоцируют резкое снижение митохондриальной активности. Эффект от окисленных УНТ заметно ниже, поэтому можно утверждать, что модифицирование (окисление) нанотрубок приводит к уменьшению уровня их токсичности по отношению к исследуемой ткани. Этот результат согласуется с общепринятым мнением о снижении токсичности нанотрубок при их химической модификации, обеспечивающей увеличение гидрофильности их поверхности.

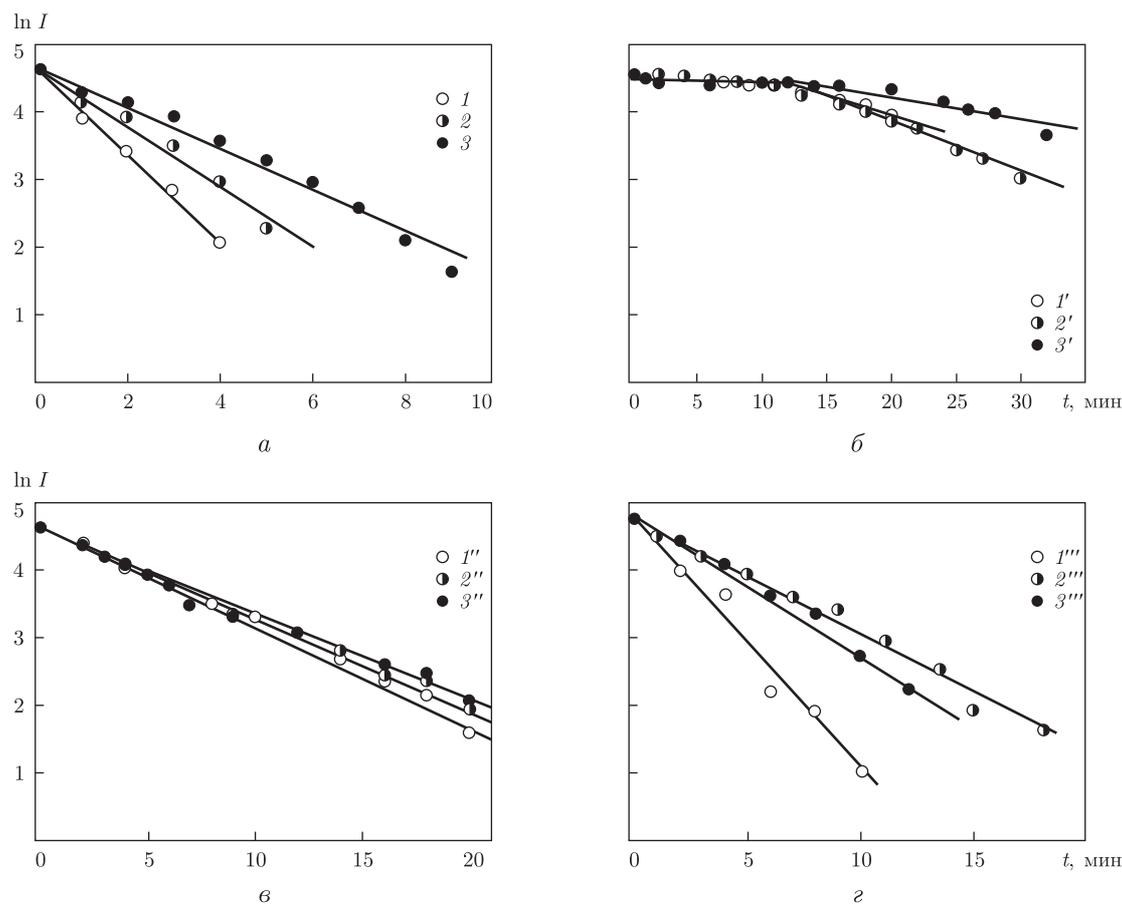


Рис. 1. Влияние УНТ на кинетику восстановления спинового зонда митохондриями клеток в гомогенатах тканей органов экспериментальных животных: почек (а); сердца (б); легких (в); печени (г). 1... 1''' – Контроль; 2... 2''' – УНТ_{окисл}; 3... 3''' – УНТ_{исх}

Чтобы объяснить эффект ингибирования митохондриальной активности клеток в присутствии УНТ, была предложена рабочая гипотеза [10, 11] о вероятной способности проводящих нанотрубок шунтировать процесс переноса электронов дыхательной цепи митохондрий. При этом нанотрубки как углеродный материал выступают, по-видимому, сильнейшим конкурентом коэнзиму Q_{10} , осуществляя электровосстановление растворенного кислорода до HO_2^- или ионов OH^- (что требует большого потребления электронов) и превращаясь в своеобразные нанoeлектроды с высоким анодным потенциалом. Высказанные суждения согласуются с известными в литературе данными [12] о способности нанотрубок образовывать с рядом ферментов (в частности, с гидрогеназой) комплексы с переносом заряда (электронов).

Данные по восстановлению спинового зонда в ткани сердечной мышцы крыс представлены на рис. 1, б. Влияние нанотрубок на митохондриальную активность этой ткани имеет свои особенности. Введение обычных нанотрубок в образцы ткани сердца, так же как и в случае ткани почек, ингибирует митохондриальную активность. При этом процесс восстановления зонда (ингибирование активности митохондрий) несколько “заторможен”, и изменения наблюдаются только на 10–12 мин. Окисленные нанотрубки не влияют на митохондриальную активность ткани сердца (практически совпадение данных с контролем), т. е. модифицированные УНТ не оказывают негативного (токсического) воздействия.

Объяснение этому факту может быть достаточно простым — в отличие от других клеток мембраны митохондрий кардиомиоцитов содержат отрицательно заряженный фосфолипид (кардиолипин), который отталкивает отрицательно заряженные окисленные нанотрубки от мембраны митохондрий, препятствуя их контакту и последующему взаимодействию.

В случае ткани легких крысы (см. рис. 1, в) не отмечается существенного ингибирования митохондриальной активности как обычными нанотрубками, так и их окисленной модификацией. Это дает основание утверждать, что УНТ не оказывают существенного токсического воздействия на легочную ткань.

Следует отметить, что похожие результаты получены и в других исследовательских центрах (например, авторами публикации [13]) при исследовании влияния УНТ на митохондрии культуры клеток легких крыс и мышей. Мы предполагаем, что отсутствие токсического эффекта УНТ относительно легочной ткани может быть связано с экранирующим действием белково-фосфолипидного комплекса (сурфактанта), покрывающего поверхность легочных альвеол.

Эти результаты имеют принципиальный характер, поскольку многие экологи делают весьма пессимистические прогнозы, в связи с резким увеличением мирового объема производства нанотрубок и их негативного воздействия, прежде всего на легкие человека и животных. Разработка экспресс-теста на токсичность производимых нанотрубок или иных углеродных наноматериалов с использованием принципа восстановления спинового зонда была бы, несомненно, полезной и своевременной при проведении экологического мониторинга.

Данные исследования токсичности нанотрубок для ткани печени иллюстрирует рис. 1, г. Для этого вида ткани наблюдались заметные эффекты ингибирования митохондриальной активности клеток после введения нанотрубок в гомогенат ткани. Интересно отметить, что в отличие от ткани почек наибольший эффект наблюдается при введении окисленных нанотрубок. Ингибирующий эффект от обычных УНТ оказался существенно меньшим. Такое различие связано, вероятно, с различием в гидрофильно-липофильном балансе сравниваемых тканей, а также в структуре и размерах их клеток.

Нам представлялось важным дать сравнительную количественную оценку ингибирующего действия УНТ на митохондриальную активность клеток тканей различных органов. Линеаризация кинетических зависимостей восстановления спинового зонда в виде уравнения $\ln I = \ln I_0 - kt$ (где I_0 и I — соответственно начальная и текущая интенсивность сигнала ЭПР, о. е.; t — время, мин) дает нам эффективные коэффициенты скорости восстановления k (тангенс угла наклона прямой) в разных условиях. Тогда ингибирующая способность нанотрубок (степень токсичности T , %) рассчитывается из соотношения:

$$T = \frac{k_c - k_{\text{УНТ}}}{k_c} \cdot 100,$$

где k_c и $k_{\text{УНТ}}$ — соответственно кинетические коэффициенты скорости восстановления спинового зонда в контрольном опыте и в присутствии нанотрубок. Результаты расчетов представлены в табл. 1.

Следует подчеркнуть, что характер взаимодействия нанотрубок с клетками ткани органов и изолированными клетками (эритроциты, тромбоциты, лимфоциты и др.) сильно отличаются. В тканях клетки соединены между собою межклеточными контактами (стабилизация мембран), что ограничивает доступ нанотрубок к мембранам клеток внутри ткани.

Таблица 1. Кинетические коэффициенты восстановления спинового зонда и степень токсичности УНТ относительно тканей различных органов экспериментальных животных (крыс)

Орган	k , мин ⁻¹ (коэффициенты детерминации (R^2))			T , %	
	контроль	контакт с УНТ _{исх}	контакт с УНТ _{окисл}	УНТ _{исх}	УНТ _{окисл}
Почки	0,642 (0,992)	0,266 (0,963)	0,420 (0,968)	58,6	34,4
Сердце	0,064 (0,974)	0,033 (0,948)	0,064 (0,936)	49,2	0
Легкие	0,144 (0,991)	0,122 (0,992)	0,132 (0,993)	15,5	8,3
Печень	0,378 (0,934)	0,201 (0,981)	0,174 (0,974)	46,8	53,9

Поэтому резистентность мембран клеток тканей относительно нанотрубок априори выше резистентности изолированных клеток.

Необходимо отметить также, что влияние нанотрубок на митохондриальную активность тканей различных органов непосредственно зависит и от сродства обычных и модифицированных УНТ к мембранам клеток тканей, т. е. от мембранотропных свойств нанотрубок, так как первым этапом любого действия УНТ на биообъект является их проникновение через мембрану клеток.

Полученные нами данные свидетельствуют об избирательной токсичности нанотрубок относительно тканей различных органов и, по-видимому, открывают новый пласт исследований по токсичности наноматериалов на тканевом уровне. При этом научно обоснованное химическое модифицирование нанотрубок следует рассматривать как путь к получению наноматериалов с минимизированным токсическим действием на изолированные клетки либо клетки тканей определенных органов.

Таким образом, впервые нами использован метод спиновых зондов для оценки токсичности обычных и окисленных нанотрубок относительно тканей почек, сердца, легких и печени экспериментальных животных (крыс). Токсичность УНТ оценивали по изменению скорости восстановления водорастворимого спинового зонда митохондриями клеток тканей.

Экспериментально доказана избирательная токсичность нанотрубок для тканей различных органов. Главная причина разнопланового воздействия нанотрубок связана, по-видимому, с существенными различиями гидрофильно-липофильного баланса сравниваемых тканей (почек и печени); с отталкивающим действием отрицательно заряженного фосфолипид (кардиолипина) в мембранах митохондрий (что препятствует их прямому контакту с окисленными нанотрубками), имеющих также отрицательный заряд поверхности (ткани сердечной мышцы); с экранирующим эффектом находящегося на поверхности альвеол сурфактанта — белково-фосфолипидного комплекса (ткани легкого).

Отсутствие токсичности окисленных УНТ для ткани сердца дает основание полагать, что направленная химическая модификация нанотрубок может существенно снизить или полностью нивелировать эффекты токсичности углеродных наноматериалов в отношении тех или иных тканей или органов в целом. Незначительная токсичность исходных и модифицированных трубок относительно легочной ткани может служить опровержением высказываемому в литературе мнению о чрезвычайно высокой и даже фатальной опасности для организма людей масштабного производства и практического использования углеродных нанотрубок.

1. *Hurt R. H., Monthieux M., Kane A.* Toxicology of carbon nanomaterials: status, trends, and perspectives on the special issue // *Carbon*. – 2006. – **44**, No 6. – P. 1028–1033.
2. *Chiaretti M., Mazzanti G., Bosco S. et al.* Carbon nanotubes toxicology and effects on metabolism and immunological modification *in vitro* and *in vivo* // *J. Phys.: Condens. Matter*. – 2008. – **20**, No 47. – P. 474203.
3. *Porter A. E., Gass M., Muller K. et al.* Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells // *Nature Nanotechnol.* – 2007. – **2**. – P. 713–717.
4. *Zhu L., Chang D. W., Dai L. et al.* DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells // *Nano Lett.* – 2007. – **7**, No 12. – P. 3592–3597.
5. *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 Nanotechnol.* – 2008. – **3**, No 4. – P. 216–221.
6. *Картель 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. *Картель Н. Т., Грищенко В. И., Черных В. П. и др.* Изучение цитотоксичности углеродных нанотрубок методом спиновых зондов // *Химия, физика и технология поверхности*. – 2008. – No 14. – С. 557–564.
8. *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, П. П. Горбика. – Киев: Наук. думка, 2007. – Т. 2. – С. 116–158.
9. *Нардід О. А.* Відновлення спінового зонда в оцінці життєздатності біологічних об'єктів // *Фізика живого*. – 2008. – **16**, № 1. – С. 44–49.
10. *Kartel M. T., Ivanov L. V., Kovalenko S. N., Tereschenko V. P.* Carbon nanotubes: biorisks and biodefence // *Biodefence. NATO Science for Peace and Security. Ser. A: Chem. and Biol.* / Ed. S. Mikhalovsky, A. Khajibaev. – Berlin ets.: Springer Sci. + Business Media B. V., 2011. – P. 11–22.
11. *Kartel M. T., Chernykh V. P., Ivanov L. V. et al.* Mechanisms of the cytotoxicity of carbon nanotubes // *Chem. Phys. Technol. Surface*. – 2011. – **2**, No 2. – P. 182–189.
12. *McDonald T. J., Svedruzic D., Kim Y.-H. et al.* Wiring-up hydrogenase with single-walled carbon nanotubes // *Nano Lett.* – 2007. – **7**, No 11. – P. 3528–3534.
13. *Thurnherr T., Brandenberger C., Fischer K. et al.* A comparison of acute and long-term effects of industrial multi-walled carbon nanotubes on human lung and immune cells *in vitro* // *Toxicol. Lett.* – 2011. – **200**, No 3. – P. 176–186.

*Институт химии поверхности
им. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев
Институт криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков*

Поступило в редакцию 01.11.2011

**Член-кореспондент НАН України М. Т. Картель, Л. В. Іванов, О. А. Нардід,
Я. О. Черкашина, О. В. Козлов, С. В. Репіна**

Оцінка дії вуглецевих нанотрубок на мітохондріальну активність клітин тканин різних органів методом спинових зондів

З використанням методу спинових зондів проведено оцінку впливу звичайних і модифікованих (окиснених) вуглецевих нанотрубок на мітохондріальну активність клітин у гомогенатах тканин печінки, нирок, серця та легень експериментальних тварин (щурів). Обговорено причини вибіркової дії нанотрубок (відмінності у гідрофільно-ліпофільному балансі досліджуваних тканин, відштовхування однойменно заряджених фосфоліпідів мембран та окиснених нанотрубок, екрануюча дія сурфактантів на альвеолах легень). Представлено кількісні дані про ступінь токсичності ВНТ відносно тканин різних органів. Висловлено передбачення про те, що спрямована хімічна модифікація нанотрубок може істотно знизити або повністю нівелювати ефекти токсичності вуглецевих наноматеріалів по відношенню до тканин або органів у цілому.

Corresponding Member of the NAS of Ukraine **N. T. Kartel, L. V. Ivanov, O. A. Nardid, Ya. O. Cherkashin, A. V. Kozlov, S. V. Repina**

Evaluation of carbon nanotube action on mitochondrial activity of tissue cells of different organs by the spin-probe method

Using spin probes, the evaluation of the impact of conventional and modified (oxidized) carbon nanotubes on the mitochondrial activity of cells in tissue homogenates of liver, kidneys, heart, and lungs of experimental animals (rats) is carried out. The reasons for the selective action of nanotubes (difference in the hydrophilic-lipophilic balances of investigated tissues, repulsion of identically charged phospholipids of membranes and oxidized nanotubes, screening action of surfactants on lunge alveolae) are discussed. Quantitative data on the level of CNT toxicity to tissues of various organs are presented. The suggestion that a directed chemical modification of nanotubes can significantly reduce or completely level the toxicity effects of carbon nanomaterials towards tissues or organs is expressed.