

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.08.071>

УДК 577.352.4:577.334:615.462

**Н.Т. Картель¹, Л.В. Иванов¹, В.А. Карачевцев², А.Н. Ляпунов³, О.А. Нардид⁴,
Я.О. Черкашина⁴, В.С. Леонтьев², А.Ю. Иванов²**

¹ Інститут хімії поверхності ім. А.А. Чуйко НАН України, Київ

² Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркина НАН України, Харків

³ НТК “Інститут монокристалів” НАН України, Харків

⁴ Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, Харків

E-mail: ivleon@ukr.net, karachevtsev@ilt.kharkov.ua

Оценка взаимодействия окисленного графена с мембранами эритроцитов и белками плазмы крови крыс методом спиновых зондов

Представлено академиком НАН України Н.Т. Картелем

Методом спиновых зондов изучено влияние окисленного графена на микровязкость мембран эритроцитов, а также вязкость водно-белковой фазы плазмы. Показано, что введение окисленного графена во взвесь эритроцитов не приводит к существенным изменениям микровязкости их мембран, а после 4 ч инкубации происходит незначительное увеличение микровязкости, по-видимому, вследствие сорбции окисленного графена на мембранах. Полученные результаты указывают на стабильность структуры мембран эритроцитов при взаимодействии с окисленным графеном, который можно считать достаточно цитосовместимым материалом. Введение окисленного графена в плазму приводит к постепенному повышению вязкости водно-белковой фазы из макромолекул сывороточного альбумина и других белков плазмы уже в течение первых суток. Приведенные данные подтверждают незначительную цитотоксичность окисленного графена по сравнению с углеродными нанотрубками, которые способны существенно увеличить микровязкость мембран эритроцитов и нарушить их целостность.

Ключевые слова: цитотоксичность окисленного графена, микровязкость мембран эритроцитов, метод спиновых зондов, сывороточный альбумин, углеродные нанотрубки.

В последнее время все чаще появляются сообщения о новых применениях графена (G), оксида графена (GO) или восстановленного оксида графена (RGO) в области биомедицинских исследований. Так, в работах [1, 2] отмечается важность и перспективность их использования для диагностики онкологических заболеваний. При этом графены могут выступать либо в качестве медиатора иммуносенсоров, либо прямыми детекторами раковых клеток в случае иммобилизации на углеродной поверхности соответствующих антител. Еще одна перспективная область применения графенов — создание систем адресной до-

© Н.Т. Картель, Л.В. Иванов, В.А. Карачевцев, А.Н. Ляпунов,
О.А. Нардид, Я.О. Черкашина, В.С. Леонтьев, А.Ю. Иванов, 2017

ISSN 1025-6415. Допов. Нац. акад. наук Укр. 2017. № 8

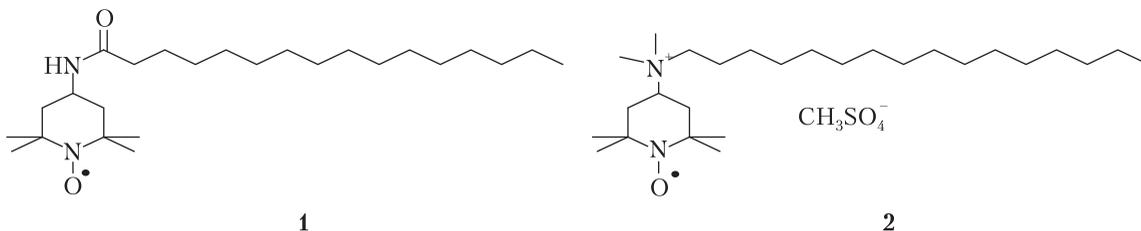
ставки диагностических и лекарственных средств, в частности в сочетании с магнитными наночастицами в качестве носителей препаратов, нуклеотидов/пептидов, флуоресцентных агентов. Интересным представляется использование графенов для фототермической терапии опухолевых клеток [3], а также лечения болезни Альцгеймера [4]. Благодаря уникальным электрическим свойствам графены действуют как электроды и способны стимулировать нейроны.

Между тем ключевым вопросом в указанных работах является факт сохранения способности различных клеток функционировать и поддаваться дифференциации после иммобилизации их на поверхности графена. Многими исследователями [1, 5] отмечается хорошая биосовместимость и нетоксичность материалов на основе графена. Однако нет окончательного ответа на вопрос как графеновые материалы взаимодействуют с клетками и плазмой крови? Поэтому определение цитотоксичности графена на примере изучения взаимодействия со структурами белков плазмы и мембранами эритроцитов имеет важное теоретическое и практическое значение.

Цель исследования состояла в изучении методом спиновых зондов влияния окисленного графена на микровязкость мембран эритроцитов и вязкость поверхностной водно-белковой матрицы макромолекул ряда сывороточных белков плазмы, в первую очередь сывороточного альбумина (СА). Микровязкость мембран клеток является важнейшим параметром, поскольку активность мембранных ферментов, структура и функционирование ионных каналов в мембранах, их проницаемость, биодоступность лекарственных веществ, скорость прохождения нервного импульса в нейронах напрямую зависят от этого параметра.

Материалы и методы исследований. В работе использован 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 и гидрофобных полостях белков плазмы [6, 7].

Зонды **1** и **2** вводили во взвесь эритроцитов или плазмы крови путем добавления их концентрированного раствора в ДМСО или метаноле таким образом, чтобы конечная концентрация растворителя во взвеси исследуемых образцов была в пределах 0,5–1 %.



Эритроцитарную массу получали из крови крыс самцов путем трехкратной отмывки физиологическим раствором (0,9 % NaCl), приготовленным на натрий-фосфатном буфере (5 ммоль/л, pH 7,2–7,4), с последующим центрифугированием (20 мин, 3000 об/мин). Надосадок после первого центрифугирования использовали в качестве плазмы. В эксперименте эритро массу и плазму крови крыс после центрифугирования разбавляли в 2 раза физиологическим раствором (количество эритроцитов около $9 \cdot 10^6$ в 1 мм^3 разбавленной

эритроциты), концентрация сывороточного альбумина в разбавленной плазме была на уровне 30 ± 5 мг/мл [8, 9]. Исследования проводили в светлое время суток на беспородных белых крысах-самцах массой 180–210 г. Кровь отбирали у группы из шести животных ($n = 6$). Все опыты проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), и “Общих этических принципов экспериментов на животных”, принятых в Украине (2001).

В работе использовали окисленный графен, полученный электрохимическим путем. По оценочным данным фурье-спектроскопии содержание кислородсодержащих групп в графене не превышало 10 %. Среди них идентифицированы карбонильные, карбоксильные, эпоксидные и гидроксильные группы. Конечная концентрация окисленного графена в водной взвеси эритроцитов или плазмы составляла 70 мкг/мл. Перед экспериментом водную взвесь графена обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин на установке Ultrasonic Cleaner.

Спектры ЭПР введенных во взвесь парамагнитных зондов регистрировали при 24 °С на радиоспектрометре ESR Spectrometer CMS8400. Микровязкость мембран эритроцитов оценивали на основе обработки интенсивности и ширины линий триплета ЭПР-спектров стабильных нитроксильных радикалов — спиновых зондов, взаимодействующих с внешним окружением (липидный бислой мембран эритроцитов, гидрофобные карманы СА, вода) [6, 7]. Для расчета времени корреляции броуновской вращательной диффузии зонда используются такие характеристики спектров: ширина центральной компоненты, интенсивность компонентов спектра ЭПР с магнитным квантовым числом ядра ^{14}N ($M = 0, +1, -1$), изотропная константа расщепления. Для оценки вязкости среды базовым является уравнение Стокса–Эйнштейна:

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

где η — вязкость среды, a — эффективный радиус спинового зонда, определяемый по спектрам ЭПР. Время корреляции броуновской вращательной диффузии зонда τ , пропорциональное вязкости мембраны η , определяется из эмпирических соотношений (см. [6, 7, 9, 10]).

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с помощью стандартных пакетов программ Statistica 7 for Windows, Microsoft Excel XP. При сравнении результатов между группами использовали модифицированный параметрический t -критерий Стьюдента для выборок с неравными дисперсиями. Рассчитывали средние величины и стандартное отклонение. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Гидрофобный зонд **1** практически не растворим в воде, но хорошо растворим в полярных и неполярных органических растворителях, поэтому растворы этого зонда в заметных концентрациях возможны лишь в водно-органических смесях. На рис. 1 приведен спектр ЭПР зонда **1**, полученного при добавлении его концентрированного раствора в ДМСО в физиологический раствор. Уширенный синглетный сигнал характерен для спектров жидких индивидуальных липофильных нитроксильных радикалов или их концентрированных растворов, в которых происходят быстрые обменные взаимодействия между нитроксильными фрагментами, чему способствует их “выталкивание” друг к другу из водной среды.

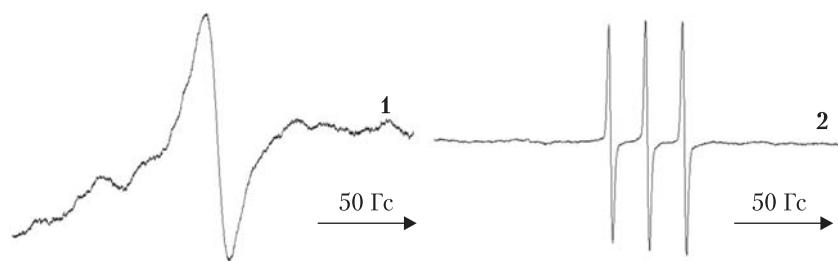


Рис. 1. Спектры ЭПР спиновых зондов **1** и **2** в физиологическом растворе

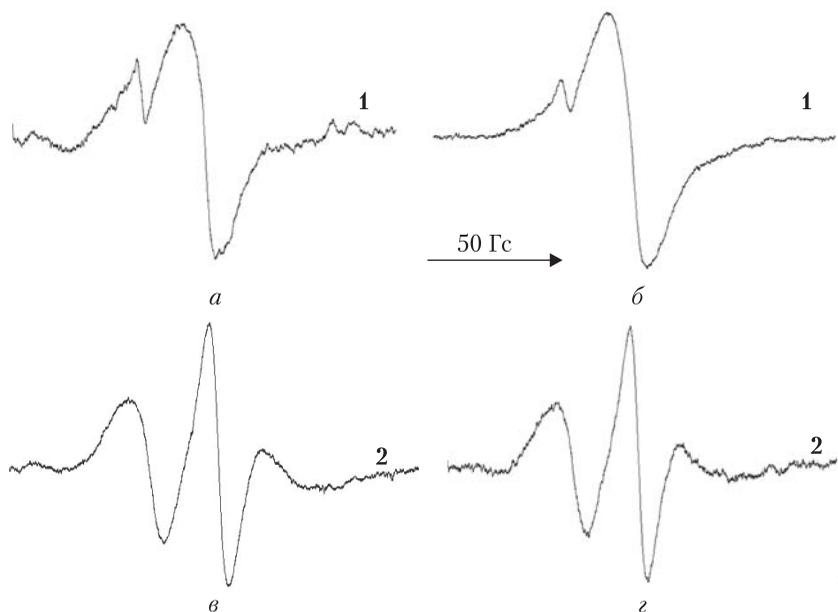


Рис. 2. Спектры ЭПР спиновых зондов **1** и **2** во взвеси эритроцитов без добавления (*а, в*) и с добавлением графена (*б, г*)

Для зонда **2**, имеющего в структуре кроме алкильного «хвоста» еще и положительный заряд на четвертичном атоме азота (и вследствие этого хорошую растворимость в воде), в физиологическом растворе наблюдается узкий триплетный сигнал ЭПР (см. рис. 1). Это свидетельствует о быстрой вращательной подвижности зонда в образованных им мицеллах [9].

На рис. 2 представлены спектры ЭПР спиновых зондов **1** и **2**, находящихся в эритроцитарной массе без присутствия и в присутствии окисленного графена. Можно видеть, что зонд **1** дает сильно асимметричный сигнал в спектре ЭПР, что свидетельствует о весьма плохом контакте зонда с поверхностью мембран. Из полученных спектров можно лишь приблизительно оценить параметр $A_{\text{изо}}$ и практически невозможно определить время корреляции (таблица). Присутствие графена в системе не повлияло на вид и характер спектра ЭПР зонда **1**.

Зонд **2** оказался более информативной меткой — его спектры ЭПР представляют собой четко выраженные триплеты из достаточно уширенных линий. Это свидетельствует о внедрении отдельных структур метки в мембраны эритроцитов и почти полном отсутствии агрегации структур зонда, что и является причиной обменных взаимодействий между структурами радикалов и в конечном итоге искажения (асимметрии) спектров ЭПР.

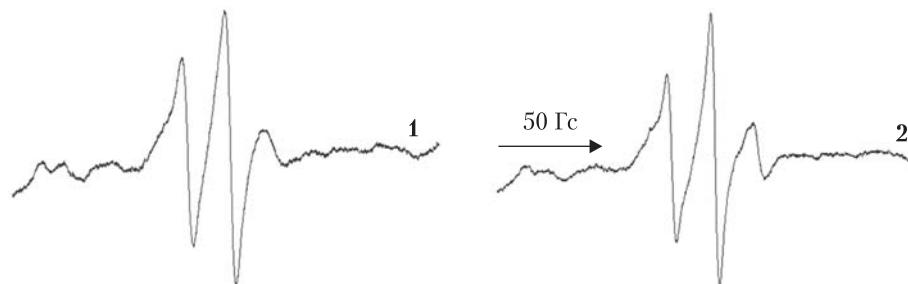


Рис. 3. Спектр ЭПР зондов **1** и **2** в белках плазмы крови

Для идентификации местонахождения нитроксильной головки спинового зонда **2** в мембране клеток оценивали полярность микроокружения нитроксильного фрагмента зонда, измеряя параметр $A_{\text{изо}}$ – расщепление (Гс) между низкополевой (h_+) и центральной (h_0) компонентами спектров ЭПР. При нахождении нитроксильной головки зонда в водном окружении $A_{\text{изо}}$ должно составлять приблизительно 17,2 Гс, а в липофильном окружении мембран клеток – 14–15 Гс [6, 7]. Нами показано, что нитроксильный фрагмент зонда **2** с неспаренным электроном находится на поверхности мембраны эритроцита в ее липидном окружении. Так, константа расщепления $A_{\text{изо}}$ в спектрах ЭПР зонда равна 15,4 Гс и соответствует нахождению нитроксильного фрагмента в неполярном окружении (см. таблицу), а вращательная броуновская диффузия зонда свидетельствует о сильно заторможенном вращении в вязкой среде липидного бислоя мембраны клеток эритроцитов [10]. Зонд **2**, обладая положительным зарядом, по-видимому, способен встраиваться в мембрану подобно

Параметры спектров ЭПР спиновых зондов 1 и 2 в мембране эритроцитов и белках плазмы крови

Образец	Зонд	Время инкубации, ч	$A_{\text{изо}}$, Гс	Время корреляции, с		
				$\tau_{+1} \cdot 10^9$	$\tau_{-1} \cdot 10^9$	$\tau_{\pm 1} \cdot 10^9$
Эритроциты (контроль)	1	—	~14	Не определяются		
	2	—	15,4	$3,19 \pm 0,27$	$1,37 \pm 0,12$	$6,2 \pm 0,49$
Эритроциты + графен	1	1	~12	Не определяются		
		4	~12	Не определяются		
	2	1	15,4	$3,45 \pm 0,30$	$1,72 \pm 0,14$	$6,30 \pm 0,50$
		4	15,4	$3,40 \pm 0,30$	$1,69 \pm 0,14$	$6,38 \pm 0,50$
Плазма (контроль)	1	—	11,7	$1,09 \pm 0,08$	$0,63 \pm 0,06$	$1,48 \pm 0,11$
	2	—	16,8	$1,74 \pm 0,13$	$1,12 \pm 0,09$	$2,92 \pm 0,23$
Плазма + графен	1	1	11,6	$1,10 \pm 0,08$	$0,64 \pm 0,05$	$1,50 \pm 0,12$
		4	12,8	$1,23 \pm 0,09$	$0,75 \pm 0,06$	$1,73 \pm 0,13$
		20	13,9	$1,47 \pm 0,11$	$0,86 \pm 0,07$	$2,14 \pm 0,17$
	2	1	16,7	$1,68 \pm 0,12$	$1,08 \pm 0,08$	$2,84 \pm 0,20$
		4	16,8	$1,64 \pm 0,12$	$1,04 \pm 0,08$	$2,79 \pm 0,20$
		20	17,2	$1,53 \pm 0,10$	$1,04 \pm 0,08$	$2,34 \pm 0,18$

фосфатидилхолину, имеющему положительно заряженную холиновую “головку” и два алкильных “хвоста”. Нитроксильный фрагмент зонда **2** “зажат” между фосфолипидными головками в мембране, поэтому его вращательная подвижность должна быть весьма чувствительна к изменению плотности упаковки фосфолипидов клеточных мембран, т.е. к микровязкости последних.

Согласно полученным данным (см. таблицу), введение окисленного графена во взвесь эритроцитов не приводит к существенным изменениям времени корреляции зонда **2** в мембране в пределах ошибки эксперимента. При инкубации графена с эритроцитами в течение 4 ч отмечается небольшая тенденция к увеличению микровязкости мембраны эритроцитов, по-видимому, вследствие сорбции графена на мембране. Этот факт дает основание утверждать, что окисленный графен не обладает цитотоксическим действием, по крайней мере, по отношению к эритроцитам. Тем самым графен, как углеродный наноматериал, существенно отличается по свойствам от углеродных нанотрубок, которые в аналогичных экспериментах инициируют резкое увеличение микровязкости мембран эритроцитов и нарушение их целостности [10].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об интактности структуры мембран клеток при взаимодействии с поверхностью графена, что очень важно в дальнейшем при создании на его базе биоматериалов, содержащих иммобилизованные клетки, сохраняющие жизнеспособность и длительную функциональную активность.

Белки плазмы крови являются важным компонентом крови, поскольку осуществляют функции питания, транспорта, поддержки биохимического и реологического статуса крови, контроля ее системы свертывания и т. д. К ним относят, прежде всего, сывороточный альбумин (СА), фибриноген и ряд аполипопротеинов [11, 12]. Белки плазмы переносят эндогенные и экзогенные субстраты, лекарственные вещества, благодаря наличию на поверхности макромолекул гидрофобных полостей, выстроенных из неполярных аминокислот.

На рис. 3 представлены спектры ЭПР спиновых зондов **1** и **2** в гидрофобных полостях белков плазмы. В основном это универсальный переносчик веществ – СА, в макромолекуле которого имеются три гидрофобные полости, которые очень эффективно связывают молекулы жирных кислот, стероидов и других гидрофобных соединений [12].

Из анализа данных таблицы следует, что при введении взвеси окисленного графена в белки плазмы, меченные зондом **1**, в течение суток происходит постепенное повышение времени корреляции и, следовательно, вязкости водно-белковой фазы, по-видимому, вследствие растянутой во времени сорбции белковых макромолекул на гидрофобной поверхности графена. Это согласуется с данными работы [11] о постепенном связывании некоторых белков плазмы, включая СА, на поверхности одностенных и многостенных углеродных нанотрубок.

В то же время для зонда **2**, связанного с гидрофобными полостями белков плазмы, не наблюдалось существенных изменений в вязкости водно-белковой фазы. Возможно, это связано с наличием у зонда **2** положительного заряда, что обуславливает отталкивание, например, от положительно заряженных фрагментов лизина внутри основной гидрофобной полости СА и препятствует плотному контакту зонда с белком [12].

Полученные результаты, а также приведенные нами данные в ранее опубликованных работах [10, 13] по изучению цитотоксичности углеродных нанотрубок позволяют сравнить

между собой цитотоксическое действие графена и нанотрубок на мембраны клеток. Наши результаты полностью согласуются с выводами работы [5] о том, что углеродные нанотрубки по сравнению с графеном являются более агрессивными и токсичными объектами по отношению к клеткам и их органеллам. Весьма показательно то, что выводы авторов работы [5] основаны на результатах исследования с клетками РС12 (модель нейронов мозга) — изменении их морфологии и нарушении их целостности, метаболической активности, в частности по ряду ферментов (лактатдегидрогеназы и каспазы), а также генерации активных форм кислорода (АФК), что объясняется так называемым оксидативным стрессом. Некоторое токсическое воздействие графена, по их мнению, связано лишь с генерацией АФК при достаточно высоких концентрациях этого наноматериала и его длительной инкубации с клетками.

Таким образом, предложенный нами способ оценки цитотоксичности углеродных наноматериалов с помощью метода спиновых зондов позволил нам впервые однозначно продемонстрировать и констатировать отсутствие выраженной цитотоксичности у окисленного графена. Этот фундаментальный вывод имеет принципиальное значение, так как открывает дополнительные возможности по созданию на основе графенов новых биоматериалов и систем биомедицинской направленности.

Работа Карачевцева В.А., Иванова А.Ю., Леонтьева В.С. выполнена благодаря поддержке НАН Украины (грант N15/17H) и ГФФИ Украины (грант Ф73/89-2016).

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Feng L., Wu L., Qu X. New horizons for diagnostics and therapeutic applications of graphene and graphene oxide. *Adv. Mater.* 2013. **25**, № 2. P. 168–186. doi: <https://doi.org/10.1002/adma.201203229>
2. Mannoor M.S., Tao H., Clayton J.D., Sengupta A., Kaplan D.L., Naik R.R., Verma N., Omenetto F.G., McAlpine M.C. Graphene-based wireless bacteria detection on tooth enamel. *Nat. Commun.* 2012. **3**, Art. 763, 8 pp. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms176>
3. Yang K., Zhang S., Zhang G., Sun X., Lee S.T., Liu Z. Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Lett.* 2010. **10**, № 9. P. 3318–3323. doi: <https://doi.org/10.1021/nl100996u>
4. Li M., Yang X., Ren J., Qu K., Qu X. Using graphene oxide high near-infrared absorbance for photothermal treatment of Alzheimer's disease. *Adv. Mater.* 2012. **24**, № 13. P. 1722–1729. doi: <https://doi.org/10.1002/adma.201104864>
5. Zhang Y., Ali S.F., Dervishi E., Xu Y., Li Z., Casciano D., Biris A.S. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ASC Nano.* 2010. **4**, № 6. P. 3181–3186. doi: <https://doi.org/10.1021/nn1007176>
6. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. Москва: Наука, 1974. 256 с.
7. Метод спиновых меток. Теория и применения. Берлинер Л. (ред.). Москва: Мир, 1979. 639 с.
8. Моисеева Н.Н., Кравченко Л.П., Семенченко А.А., Петренко А.Ю. Влияние трансплантации гепатоцитов, подвергнутых гипотермическому хранению, на регенерацию печени крыс после частичной гепатэктомии. *Пробл. криобиологии.* 2002. № 1. С. 24–31.
9. Иванов Л.В., Ляпунов А.Н., Картель Н.Т., Нардид О.А., Окотруб А.В., Кирилюк И.А., Черкашина Я.О. Доставка липофильных спиновых зондов углеродными нанотрубками в эритроциты и плазму крови. *Поверхность.* 2014. Вып. 6. С. 292–304.
10. Картель Н.Т., Иванов Л.В., Ляпунов А.Н., Нардид О.А., Окотруб А.В., Кирилюк И.А., Черкашина Я.О. Оценка влияния углеродных нанотрубок на микровязкость мембран эритроцитов. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2015. № 3. С. 114–121. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2015.03.114>

11. Salvador-Morales C., Flahaut E., Sim E., Sloan J., Green M.L.H., Sim R.B. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol. Immunol.* 2006. **43**, № 3. P. 193–201. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.02.006>
12. Биохимическая фармакология. Сергеев П.В. (ред.). Москва: Высш. шк., 1982. 343 с.
13. Картель Н.Т., Грищенко В.И., Черных В.П., Иванов Л.В., Нардид О.А., Семенцов Ю.И., Приходько Г.П., Коваленко С.Н., Губин Ю.И., Репина С.В. Использование метода спиновых зондов для оценки цитотоксичности углеродных нанотрубок. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2009. № 8. С. 127–133.

Поступило в редакцию 11.04.2017

REFERENCES

1. Feng, L., Wu, L. & Qu, X. (2013). New horizons for diagnostics and therapeutic applications of graphene and graphene oxide. *Adv. Mater.*, 25, No. 2, pp. 168-186. doi: <https://doi.org/10.1002/adma.201203229>
2. Mannoor, M.S., Tao, H., Clayton, J. D., Sengupta, A., Kaplan, D. L., Naik, R. R., Verma, N., Omenetto, F. G. & McAlpine, M. C. (2012). Graphene-based wireless bacteria detection on tooth enamel. *Nat. Commun.*, 3, Art. 763, 8 pp. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms1767>
3. Yang, K., Zhang, S., Zhang, G., Sun, X., Lee, S. T. & Liu, Z. (2010). Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Lett.*, 10, No. 9, pp. 3318-3323. doi: <https://doi.org/10.1021/nl100996u>
4. Li, M., Yang, X., Ren, J., Qu, K. & Qu, X. (2012). Using graphene oxide high near-infrared absorbance for photothermal treatment of Alzheimer's disease. *Adv. Mater.*, 24, No. 13, pp. 1722-1728. doi: <https://doi.org/10.1002/adma.201104864>
5. Zhang, Y., Ali, S. F., Dervishi, E., Xu, Y., Li, Z., Casciano, D. & Biris, A. S. (2010). Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural pheochromocytoma-derived PC12 cells. *ASC Nano*, 4, No. 6, pp. 3181-3186. doi: <https://doi.org/10.1021/nn1007176>
6. Liechtenstein, G. I. (1974). The method of spin labels in molecular biology. Moscow: Nauka (in Russian).
7. Berliner, L. (Ed). (1979). The method of spin labels. Theory and applications. Moscow: Mir (in Russian).
8. Moiseeva, N. N., Kravchenko, L. P., Semenchenko, A. A., Petrenko, A. Yu. (2002). Effect of transplantation of hepatocytes subjected to hypothermic storage on liver regeneration in rats after partial hepatectomy. *Probl. Cryobiol.*, No. 1, pp. 24-31 (in Russian).
9. Ivanov, L. V., Lyapunov, O. M., Kartel, M. T., Nardid, O. A., Okotrub, A. V., Kirilyuk, I. A., Cherkashina, Ya. O. (2014). Delivery of spin probes by carbon nanotubes in erythrocytes and plasma of blood. *Surface*, Iss. 6, pp. 292-304.
10. Kartel, M. T., Ivanov, L. V., Lyapunov, O. M., Nardid, O. A., Okotrub, A. V., Kirilyuk, I. A. & Cherkashina, Ya. O. (2015). Estimation of the effect of carbon nanotubes on the microviscosity of erythrocyte membranes by the spin probe method. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 3, pp. 114-121 (in Russian). doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2015.03.114>
11. Salvador-Morales, C., Flahaut, E., Sim, E., Sloan, J., Green, M.L.H. & Sim, R.B. (2006). Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol. Immunol.*, 43, No. 3, pp. 193-201. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.02.006>
12. Sergeev, P. V. (Ed). (1982). *Biochemical Pharmacology*. Moscow: Vysshaya shkola (in Russian).
13. Kartel, N. T., Grischenko, V. I., Chernukh, V. P., Ivanov, L. V., Nardid, O. A., Sementsov, Yu. I., Prikhod'ko, G. P., Kovalenko, S. N., Gubin, Yu. I. & Repina, S. V. (2009). Application of the spin label method to estimate cytotoxicity of carbon nanotubes. *Dopov. Nac. acad. nauk. Ukr.*, No. 8, pp. 127-133 (in Russian).

Received 11.04.2017

М.Т. Картель¹, Л.В. Иванов¹, В.О. Карачевцев²,
О.М. Ляпунов³, О.А. Нардід⁴, Я.О. Черкашина⁴, В.С. Леонтьев², О.Ю. Иванов²

¹ Інститут хімії поверхні ім. О.О.Чуйка НАН України, Київ

² Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І.Веркіна НАН України, Харків

³ НТК "Інститут монокристалів" НАН України, Харків

⁴ Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: ivleon@ukr.net, karachevtsev@ilt.kharkov.ua

ОЦІНКА ВЗАЄМОДІЇ ОКИСНЕНОГО ГРАФЕНУ З МЕМБРАНАМИ ЕРИТРОЦИТІВ І БІЛКАМИ ПЛАЗМИ КРОВІ ЩУРІВ МЕТОДОМ СПІНОВИХ ЗОНДІВ

Методом спінових зондів вивчено вплив окисненого графену на мікров'язкість мембран еритроцитів, а також в'язкість водно-білкової фази плазми. Показано, що введення окисненого графену в суспензію еритроцитів не спричиняє істотних змін мікров'язкості їх мембран, а після 4 год інкубації відбувається незначне збільшення мікров'язкості, мабуть, внаслідок сорбції окисненого графену на мембранах. Отримані результати вказують на стабільність структури мембран еритроцитів у разі взаємодії з окисненим графеном, який можна вважати досить цитосумісним матеріалом. Введення окисненого графену до плазми зумовлює поступове підвищення в'язкості водно-білкової фази з макромолекул сироваткового альбуміну та інших білків плазми вже протягом першої доби. Наведені дані підтверджують незначну цитотоксичність окисненого графену порівняно з вуглецевими нанотрубками, які здатні істотно збільшити мікров'язкість мембран еритроцитів і порушити їх цілісність.

Ключові слова: цитотоксичність окисненого графену, мікров'язкість мембран еритроцитів, метод спінових зондів, сироватковий альбумін, вуглецеві нанотрубки.

N.T. Kartel¹, L.V. Ivanov¹, V.A. Karachevtsev²,
A.N. Lyapunov³, O.A. Nardid⁴, Ya.O. Cherkashina⁴, V.S. Leontiev², A.Yu. Ivanov²

¹ Chuiko Institute of Surface Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev

² B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine, Kharkiv

³ Institute for Single Crystals of the NAS of Ukraine, Kharkiv

⁴ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

E-mail: ivleon@ukr.net, karachevtsev@ilt.kharkov.ua

ESTIMATION OF THE INTERACTION OF OXIDIZED GRAPHENE WITH RAT'S ERYTHROCYTE MEMBRANES AND BLOOD PLASMA PROTEINS BY THE METHOD OF SPIN PROBES

The effect of oxidized graphene on the microviscosity of erythrocyte membranes, as well as the viscosity of the water-protein plasma phase, is studied by the spin probe method. The introduction of oxidized graphene into a suspension of erythrocytes did not lead to significant changes in the microviscosity of their membranes. After four hours of incubation, an insignificant increase in the microviscosity is observed, apparently due to the sorption of oxidized graphene on membranes. The obtained results indicate the stability of the structure of erythrocyte membranes upon the interaction with oxidized graphene, which can be considered a sufficiently cytocompatible material. The introduction of oxidized graphene into plasma leads to a gradual increase in the viscosity of the water-protein phase from the macromolecules of serum albumin and other plasma proteins within the first 24 hours. The obtained data confirm the insignificant cytotoxicity of oxidized graphene in comparison with carbon nanotubes, which are able to significantly increase the membrane microviscosity of erythrocyte and break their integrity.

Keywords: cytotoxicity of oxidized grapheme, microviscosity of erythrocyte membranes, spin probe method, serum albumin, carbon nanotubes.