

Л.В. Иванов¹, Н.Т. Картель¹, А.Н. Ляпунов², О.А. Нардид³, Я.О. Черкашина³,
Е.В. Щербак⁴, О.А. Гурова⁵, А.В. Окотруб⁵

ВЛИЯНИЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОЧАСТИЦ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ НА МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

¹ Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина, E-mail: nikar@kartel.kiev.ua

² Институт монокристаллов Национальной академии наук Украины
просп. Науки, 60, Харьков, 61072, Украина

³ Институт криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины
ул. Переяславская, 23, Харьков, 61016, Украина

⁴ Харьковская зооветеринарная академия
ул. Академическая, 1, Малая Даниловка, Харьковская обл., 62341, Украина

⁵ Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН
просп. Академика М.А. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090, Россия

Микровязкость мембран эритроцитов напрямую связана с их целостностью, нарушение которой в присутствии инородных объектов проявляется в резком повышении показателя микровязкости, что безусловно свидетельствует о степени цитотоксического воздействия объектов, контактирующих с клетками живого организма.

Методом спиновых зондов проведено сравнительное изучение влияния ряда углеродных наночастиц на микровязкость мембран эритроцитов крыс. Установлено, что присутствие окисленного графена (ОГ) во взвеси эритроцитов практически не влияет на показатель микровязкости мембран. В присутствии углеродных нанотрубок (УНТ) различной структуры при длительной (24 ч) их инкубации с эритроцитами отмечается увеличение показателя микровязкости мембран эритроцитов в 1.5–2 раза. Наибольший эффект оказывают окисленные многостенные нанотрубки. Меньшее воздействие оказывают гидрофобные многостенные УНТ, а одностенные нанотрубки характеризуются незначительным воздействием на мембраны. Инкубация эритроцитов с углеродными нанохорнами (УНХ) приводит к существенному увеличению микровязкости мембран эритроцитов на 60 % и выше; через 1 ч инкубации полярность поверхности липидного слоя мембран скачкообразно возрастает, по-видимому, вследствие деструкции мембраны и попадания туда молекул воды, а также разупорядоченности фосфолипидов. Введение наночастиц детонационного наноалмаза (ДНА) во взвесь эритроцитов в концентрации 25 мкг/мл не оказывало заметного изменения показателя микровязкости мембран. Повышение концентрации ДНА во взвеси эритроцитов до 50 и 75 мкг/мл приводило к снижению показателя микровязкости мембран эритроцитов (повышению текучести мембран) соответственно на 20 и 28 %. Таким образом, среди углеродных наночастиц цитотоксичность могут проявлять нанотрубки и нанохорны, что обусловлено, главным образом, их структурой, размерами и формой.

Ключевые слова: наночастицы, спиновые зонды, микровязкость мембран, графен, нанотрубки, нанохорны, наноалмазы, цитотоксичность

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время углеродные наночастицы из-за своих уникальных физико-химических свойств находят широкое применение в химии, биологии и медицине в качестве средств адресной доставки биологически активных веществ и лекарств, биосенсоров, материалов и устройств прямой терапии на уровне клеток тканей, векторов генной инженерии и т.д. [1–6]. Вопрос о

цитотоксичности углеродных наночастиц до настоящего времени остается ключевым [7, 8], поскольку возможности биомедицинского применения углеродных наночастиц определяются степенью биосовместимости и токсичности по отношению к клеткам органов и тканей живого организма.

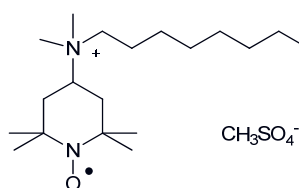
Микровязкость мембран является одним из важнейших параметров клеток, т.к.

ферментативная активность мембранных ферментов, структура и функционирование ионных каналов в мембране, проницаемость мембран, биодоступность лекарственных веществ, скорость прохождения нервного импульса в нейронах и пр. напрямую зависят от микровязкости (текучести) мембран клеток.

Цель настоящей работы – сравнительное изучение влияния водных взвесей окисленного графена (ОГ), углеродных нанотрубок (УНТ) различной структуры, исходных и окисленных углеродных нанохорнов (УНХ) и детонационных нанодiamondов (ДНА) на микровязкость мембран эритроцитов крыс методом спиновых зондов. Предполагалось, что такое исследование позволит определить основные факторы, влияющие на цитотоксичность изучаемых наночастиц – размеры наночастиц, их геометрия, форма, технология синтеза, удельная поверхность и др.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использован метод спиновых зондов, который давно успешно применяется в биофизике, молекулярной биологии, фармакологии и медико-биологических исследованиях [9, 10]. В этом методе по спектрам электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) стабильного нитроксильного радикала (спинового зонда), вводимого в биообъект, судят о микровязкости и полярности микроокружения зонда, конформационных изменениях в белках и мембранах клеток, текучести липидов мембран и целостности мембран клеток, митохондриальной активности, сродстве веществ и лекарств к мембранам и белкам, топографии больших и сложных ферментов. В данном исследовании использован спиновый зонд на основе пальмитиновой кислоты – нитроксильный радикал 4-(N,N-диметил-N-гексадециламмоний) - ТЕМПО:



Зонд содержит в своём составе четвертичный аммониевый фрагмент, благодаря чему может рассматриваться как ионогенное ПАВ.

Введение зонда в водную взвесь эритроцитов осуществляли добавлением концентрированного раствора зонда в диметилсульфоксиде (ДМСО) таким образом, чтобы конечная концентрация ДМСО во взвеси эритроцитов была в пределах 0.5–1 %. Регистрацию спектров ЭПР осуществляли на радиоспектрометре «ESR Spectrometer CMS8400». Оценка микровязкости мембран эритроцитов проводилась на основе обработки интенсивности и ширины линий триплета ЭПР-спектров нитроксильных радикалов – спинового зонда, находящегося в липидном бислое мембран эритроцитов. Для расчета времени корреляции броуновской вращательной диффузии зонда (τ) используются такие 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 ($A_{\text{изо}}$). Базовым уравнением для оценки вязкости любых сред является уравнение Стокса-Эйнштейна:

$$\tau = 4\pi a^3 \cdot \eta / 3kT, \quad (1)$$

где: τ_c – время корреляции спинового зонда (время, за которое спиновый зонд поворачивается на 1 радиан, 57°), η – вязкость среды, a – эффективный радиус спинового зонда, определяемый по спектрам ЭПР. Тогда согласно [9, 10]:

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

$$1/\tau_{c(-1)} = 3.6 \cdot 10^9 / [(h_0/h_{-1})^{1/2} - 1] \Delta H_0 \text{ (с}^{-1}\text{)} \quad (2б)$$

$$\tau_{c(+1/-1)} = 6.65 \cdot 10^{-10} / [(h_{+1}/h_{-1})^{1/2} - 1] \Delta H_{+1} \text{ (с)} \quad (2в)$$

Для оценки влияния ДНА на ориентацию фосфолипидов в мембране эритроцитов использовали параметр анизотропии спектров ЭПР зондов в липидах мембран ϵ . В монографии [9] рассмотрено влияние анизотропии тензора вращательной диффузии нитроксильных радикалов (спиновых зондов) на параметры их спектров

ЭПР. Теория спектров ЭПР связывает экспериментальный параметр анизотропии спектров (ε) с величиной анизотропии вращательной диффузии радикала. Анизотропия спектров ЭПР определяется из спектров ЭПР согласно следующей формуле:

$$\varepsilon = [(h_0 / h_{+1})^{1/2} - 1] / [(h_0 / h_{-1})^{1/2} - 1]. \quad (3)$$

Эритроциты для исследований получали из крови белых крыс-самцов. Для удаления плазмы и лейкоцитов кровь центрифугировали 5 мин при ускорении 1500 g. Лейкоцитарную пленку и супернатант удаляли методом аспирации. Осадок эритроцитов трижды отмывали путем центрифугирования при 1500 g в течение 3 мин в 10-кратном объеме фосфатно-солевого буфера (0.15 моль/л NaCl, 0.01 моль/л фосфатный буфер, pH 7.4) и хранили при 4 °С в течение 4 ч. Данную работу выполняли в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными V Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2013) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Получение окисленного графена (ОГ) и оценка его структуры с помощью ИК-Фурье спектроскопии описаны в [11]. У оксида графена, используемого в эксперименте, число краевых кислородсодержащих групп (согласно паспортным данным) не превышает 10 %. Концентрация окисленного графена во взвеси эритроцитов составляла 70 мкг/мл.

Изучали несколько типов углеродных нанотрубок, полученных в Киеве и Новосибирске:

УНТ-К1 – суммарную фракцию 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 – окисленную модификацию УНТ-К, полученную 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 получены в отделе физикохимии нанопористых и наноразмерных углеродных материалов Института химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины (Киев), а серии Н1, Н2 и Н3 в лаборатории физикохимии наночастиц Института неорганической химии СО РАН (Новосибирск). Перед введением 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). Изучаемые УНТ вводили во взвесь эритроцитов в концентрации 150 мкг/мл.

Углеродные нанохорны (УНХ) были получены методом электродугового синтеза, описание которого детально представлено в работах [12, 13]. Для очистки от побочных продуктов и придания гидрофильных свойств УНХ, синтезированный образец окисляли 3 М раствором азотной кислоты при температуре 70 °С в течение 1 ч. После окисления образец промывали до нейтрального pH и высушивали в сушильном шкафу 10 ч при температуре 100 °С. По данным электронной микроскопии УНХ представляют собой агломерированные наночастицы со средним диаметром ~60 нм, а после окисления ~52 нм. Удельная поверхность образца до и после окисления составила соответственно 230 и 443 м²/г. Перед экспериментом водную взвесь нанохорнов обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин на установке Ultrasonic Cleaner. Конечная концентрация исходных или окисленных УНХ в водной взвеси эритроцитов составляла ~100 мкг/мл.

Детонационные наноалмазы УДА-Ф9 со средним размером агрегатов около 20 нм произведены в РФ и предоставлены для исследования коллегами из Института неорганической химии СО РАН и Новосибирского государственного университета, РФ.

Целью работы не являлось измерение абсолютных значений вязкости мембран эритроцитов, а регистрация относительных изменений микровязкости мембран в присутствии изучаемых наночастиц. Для статистической обработки полученных данных применяли пакет прикладных программ «Statistica 6.0» (США). Результаты исследования представлены в виде средних значений, отклонение – стандартной ошибки среднего. Статистическую значимость различий между значениями оценивали с

помощью t -критерия Стьюдента; значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены спектры ЭПР зонда в эритроцитах в отсутствии и присутствии взвеси окисленного графена. В отличие от других углеродных наночастиц введение ОГ во взвесь эритроцитов практически не изменяет характер анизотропности спектра ЭПР зонда. Для зонда с положительным зарядом в молекуле, моделирующего основной фосфолипид мембран клеток фосфатидилхолин, в спектрах ЭПР наблюдается нормальный заторможенный триплет, позволяющий рассчитать время корреляции нитроксильного радикала в липидах мембран.

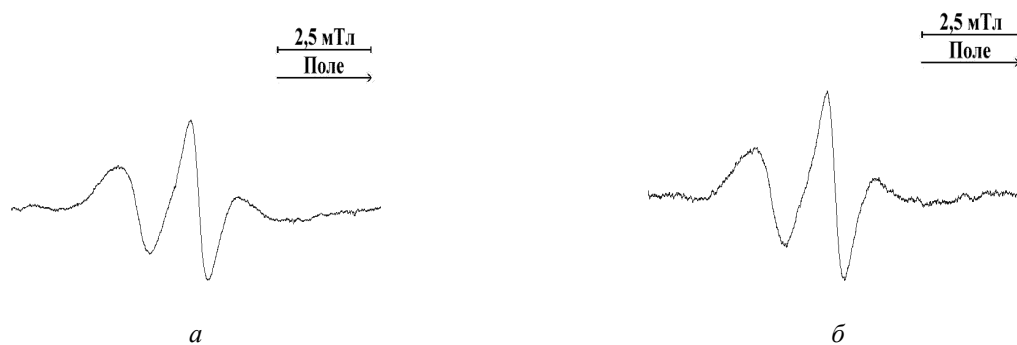


Рис. 1. Спектр ЭПР спинового зонда во взвеси эритроцитов (контроль) при 25 °С (а) и во взвеси эритроцитов в присутствии 70 мкг/мл взвеси окисленного графена при 25 °С (б)

Можно также оценить полярность микроокружения нитроксильного фрагмента спиновых зондов в мембране, измеряя параметр $A_{изо}$ – изотропная константа сверхтонкой структуры (СТС). $A_{изо}$ – это расстояние в гауссах между низкопольной (h_{-1}) и центральной (h_0) компонентами спектров ЭПР. Растворитель оказывает существенное влияние на параметр $A_{изо}$, изменяя ее от 14.5 Гс в неполярных растворителях до 17.0 Гс в воде [9]. Изменение $A_{изо}$ в мембране указывает на соответствующие изменения в липидном бислое мембран эритроцитов под действием наночастиц.

В табл. 1 представлены значения времени корреляции зонда в мембране эритроцитов, рассчитанные из спектров ЭПР, пропорциональные микровязкости липидов мембран

эритроцитов. Из данных таблицы следует, что присутствие 70 мкг/мл взвеси окисленного графена в эритроцитах не влияет на микровязкость мембран в пределах ошибки эксперимента. С течением времени наблюдается некоторая тенденция незначительного увеличения микровязкости мембран эритроцитов, по-видимому, вследствие медленного увеличения контакта плоскости графена с мембраной эритроцитов. Полученные результаты демонстрируют сохранение интактной структуры мембран клеток при взаимодействии с поверхностью графена и очень важны для объяснения сорбции различных клеток на поверхности графена с последующим их функционированием (например, дифференциация стволовых клеток на нейроны и глию) [1].

Таблица 1. Параметры спектров ЭПР спинового зонда в мембране эритроцитов в присутствии окисленного графена

Образец	$A_{изо},$ Гс	$\tau_{+1} \cdot 10^9,$ с	$\tau_{-1} \cdot 10^9,$ с	$\tau_{+1} \cdot 10^9,$ с
эритроциты (контроль)	15.4	3.19±0.27	1.37±0.12	6.20±0.49
эритроциты+графен	15.4	3.07±0.26	1.50±0.12	6.08±0.48
эритроциты+графен, 1 ч инкубации	15.4	3.45±0.30	1.72±0.14	6.30±0.50
эритроциты+графен, 4 ч инкубации	15.4	3.40±0.30	1.69±0.14	6.38±0.50

В работе [14] было показано, что углеродные нанотрубки (УНТ) способны в течение суток проникать через липидный бислой цитоплазматической мембраны внутрь клетки (трансмембранная диффузия), взаимодействовать с внутриклеточными органеллами, ядром и ДНК, в результате чего через несколько дней клетка погибала. Процесс трансмембранной диффузии УНТ внутрь клеток можно разделить на несколько последовательных этапов: сорбция УНТ 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 мы предположили, что по спектрам ЭПР зондов в мембране 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 УНТ в мембрану (24 ч инкубации) получили экспериментальное подтверждение. В табл. 2 представлены значения времени корреляции зонда в мембранах эритроцитов в отсутствие и присутствие ряда УНТ с различной структурой через 4 и 24 ч инкубации УНТ с эритроцитами. Важны относительные

изменения τ по сравнению с контролем, из чего можно судить о масштабе изменений микровязкости мембран под действием нанотрубок.

Анализ данных табл. 1 показывает, что в ряде случаев первоначальная сорбция изучаемых нанотрубок на мембранах эритроцитов сопровождается некоторым уменьшением времени корреляции зонда в мембране, то есть ее микровязкость сначала уменьшается. По-видимому, это связано с нарушением жидкокристаллической структуры поверхностного липидного слоя мембран эритроцитов под действием УНТ, нарушением взаимодействия и ориентации фосфолипидных головок фосфолипидов мембран. Однако в дальнейшем (через сутки инкубации нанотрубок с эритроцитами) наблюдается значительное увеличение микровязкости мембран, что, скорее всего, связано с проникновением крупных по размерам нанообъектов (УНТ) внутрь мембраны [15].

При длительной инкубации для всех нанотрубок характерна способность к увеличению микровязкости мембран эритроцитов в 1.5–2 раза [15]. 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 (нанобиогбриды).

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-К1, УНТ-К2 и УНТ-Н2). Для одностенных нанотрубок УНТ-Н3 воздействие на вязкость мембран намного слабее, чем многостенных. Меньший размер УНТ-Н3 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).

По активности воздействовать на мембраны эритроцитов, т.е. увеличивать их микровязкость, изучаемые нанотрубки можно расположить в ряд [14]:

УНТ-К2 > УНТ-К1 > УНТ-Н2 > УНТ-Н1 > УНТ-Н3.

В табл. 3 представлены данные о влиянии исходных и окисленных наночорнов на время корреляции зонда в мембране эритроцитов [16].

Таблица 2. Значения τ , рассчитанные из спектров ЭПР зонда в эритроцитах в присутствии УНТ при 25 °С и оценка изменения вязкости мембран

Система	Время инкубации, ч	Время корреляции, сек		Вязкость, отн. ед.
		$\tau_{+1} \cdot 10^9$	$\tau_{+1/-1} \cdot 10^9$	
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 зондом (рассчет $\tau_{+1/-1}$) принята за 1

Таблица 3. Значения τ , рассчитанные из спектров ЭПР зонда в эритроцитах в присутствии 100 мкг/мл УНХ при 25 °С

Система	$A_{изо}$, Гс	$\tau_{c+1/-1} \cdot 10^9$, с	ϵ
эритроциты (контроль)	14.3	9.41±0.75	0.23
эритроциты с УНХ через 10 мин контакта	14.5	13.5±1.1	0.19
эритроциты с УНХ через 1 ч контакта	16.1	15.3±1.2	0.19
эритроциты с окисленными УНХ через 10 мин контакта	14.3	14.3±1.1	0.16
эритроциты с окисленными УНХ через 1 ч контакта	15.6	13.6±1.1	0.19

Присутствие в системе УНХ влияет на параметры спектров ЭПР, причем это влияние просматривается в динамике. Так, инкубация эритроцитов с УНХ уже через

10 мин несколько увеличивает $A_{изо}$ с 14.3 до 14.5 Гс и в 1.43 раза увеличивается время корреляции зонда в мембранах эритроцитов (т.е. увеличивается микровязкость мембран).

Через 1 ч инкубации $A_{\text{изо}}$ увеличилось до 16.1 Гс, что свидетельствует о значительном увеличении полярности в области верхних слоев мембран вследствие разупорядоченности фосфолипидов в верхних слоях мембраны и попадания молекул воды в верхние слои (рис. 2). При этом и микровязкость мембран увеличивается еще больше по сравнению с контролем. Возрастание микровязкости мембран эритроцитов под действием нанохорнов составляет около 60 %. Особая геометрия и достаточно развитая поверхность наночастиц

УНХ, как и в случае с углеродными нанотрубками [15], способствуют их связыванию с поверхностью мембран эритроцитов. По-видимому, это приводит к резкому торможению (замедлению) конформационной подвижности фосфолипидов и снижению латеральной диффузии фосфолипидов вдоль поверхности мембран, а также к увеличению полярности поверхностного слоя мембран. О влиянии нанохорнов на разупорядочение фосфолипидов мембран свидетельствует также падение параметра анизотропии спектров ЭПР ε с 0.23 до 0.19 [9].

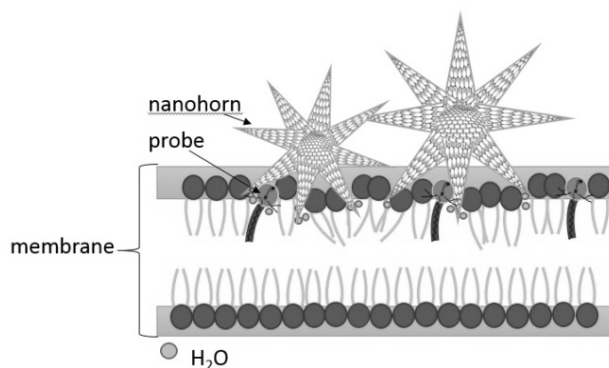


Рис. 2. Схема взаимодействия нанохорнов с поверхностью липидного бислоя клеточной мембраны (https://ru.wikipedia.org/wiki/Клеточная_мембрана)

Введение в эритроциты окисленных УНХ сразу вызывает резкое увеличение микровязкости мембран – время корреляции зонда в мембране возрастает в 1.52 раза, а параметр анизотропии спектров ε «падает» с 0.23 до 0.16. Это свидетельствует о сильной иммобилизации поверхности мембраны эритроцитов при связывании ее с окисленными нанохорнами и заметном изменении ориентации фосфолипидов, их разупорядоченности (площадь поверхности окисленных нанохорнов в 2 раза больше площади исходных нанохорнов). Через 1 ч инкубации наблюдается некоторая релаксация состояния мембраны – значения микровязкости остаются высокими, но на 10–15 % ниже, чем сразу после введения в эритроциты окисленных нанохорнов. Параметр ε также «релаксирует» – повышается с 0.16 до 0.19. В этом случае, по-видимому, включаются адаптационные механизмы клетки после некоторого стресса, вызванного введением в эритроциты окисленных УНХ. К таковым можно отнести

конформационные изменения основного белка мембран спектрина, а также латеральную диффузию фосфолипидов в плоскости мембраны эритроцитов. В то же время через 1 ч инкубации клеток с окисленными УНХ $A_{\text{изо}}$ увеличилась с 14.3 до 15.6 Гс. Это может быть обусловлено увеличением полярности в районе нитроксильной головки зонда вследствие деструкции мембраны из-за внедрения иголок нанохорнов вглубь мембраны. Зафиксированный нами эффект релаксации мембраны эритроцитов после введения окисленных УНХ можно отнести в пользу наночастиц этого типа, как обладающих меньшей цитотоксичностью по сравнению с исходными нанохорнами. Увеличение полярности липидного слоя мембран эритроцитов и разупорядоченность фосфолипидов на поверхности мембран в присутствии нанохорнов можно объяснить деструкцией наружного слоя мембран под действием нанохорнов. В первую очередь это связано с особенностями игольчатой

структуры нанохорнов. Возможно, это является основным механизмом цитотоксического действия нанохорнов [16].

В начале работы мы сообщали, что отличие нанохорнов от других наночастиц (нанотрубки) состоит в том, что в технологии их синтеза отсутствуют металлы - катализаторы. Поэтому нанохорны считаются малотоксичными, что подтверждается исследователями работы [17]. При пероральном введении (вплоть до дозы 2000 мг/кг) острой токсичности также установить не удалось. Однако вышеприведенные данные свидетельствуют об обратном – игольчатая форма нанохорнов может наносить ущерб поверхности мембран клеток, особенно в сочетании с высоко-развитой поверхностью нанохорнов. Гладкая структура поверхности нанотрубок, с одной

стороны, имеет свои плюсы при взаимодействии с мембранами клеток, но присутствие металлов – катализаторов в технологии синтеза УНТ и большие размеры тяжелых нанотрубок нивелируют благоприятную геометрию нанотрубок в отношении цитотоксичности.

Введение ДНА во взвесь эритроцитов в концентрации 25 мкг/мл не приводит к каким-либо изменениям времени корреляции зонда в мембране, а следовательно и микровязкости мембран эритроцитов в пределах ошибки эксперимента. В то же время повышение концентрации ДНА во взвеси эритроцитов до 50 и 75 мкг/мл приводит к заметному уменьшению микровязкости мембран эритроцитов (повышению текучести мембран) на 20 и 28% соответственно (табл. 4).

Таблица 4. Влияние различных концентраций взвеси детонационных наноалмазов (ДНА) на время корреляции спинового зонда в мембранах эритроцитов при 25 °С

Образец	$A_{изо}, Гс$	$\tau_{-1} \cdot 10^9$	$\tau_{+1} \cdot 10^9$	ε
эритроциты (контроль1)	14.0	1.37±0.12	6.05±0.52	30
эритроциты+25 мкг/мл ДНА	14.1	1.31±0.11	5.87±0.50	
эритроциты (контроль2)	13.9	2.41±0.21	4.95±0.43	0.22
эритроциты+50 мкг/мл ДНА	14.2	1.82±0.15	3.85±0.33	0.27
эритроциты+75 мкг/мл ДНА	14.0	1.73±0.15	3.48±0.30	0.30

Физиологически увеличение текучести мембран эритроцитов имеет большое значение для организма, т.к. позволяет эритроцитам лучше проникать через тонкие или суженные капилляры и более эффективно питать кислородом ткани и органы организма. Кроме этого, увеличение текучести мембран клеток повышает активность мембранных ферментов, что должно приводить к активизации обменных и регуляторных процессов в клетках и в организме в целом. Возможно этим можно объяснить успешное применение ДНА в онкологии, лечении желудочно кишечного тракта, проявление заметной антиоксидантной активности и т.д. В то же время чрезмерное увеличение текучести мембран клеток при больших концентрациях ДНА может приводить к необратимым изменениям

в нативной структуре мембран клеток. Имеются публикации о повреждающем действии ДНА на лимфоциты и эритроциты крови.

ВЫВОДЫ

Методом спиновых зондов изучено сравнительное влияние ряда наночастиц на микровязкость мембран эритроцитов крысы. Показано, что присутствие ОГ во взвеси эритроцитов не влияет на микровязкость мембран в пределах погрешности эксперимента. Низкая цитотоксичность ОГ, по-видимому, связана с «легкой» конструкцией двумерного графена, плоской формой наночастицы и минимальным количеством контактов с мембранами эритроцитов по сравнению с другими изучаемыми углеродными наночастицами.

Проведена оценка микровязкости мембран эритроцитов в присутствии углеродных нанотрубок (УНТ) различной структуры в течение короткого (4 ч) и длительного (24 ч) периодов инкубации. 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 в первую очередь зависит от размера «тяжелых» трубок и химии их 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 углеродных наночастиц.

Инкубация эритроцитов с исходными нанохорнами (УНХ) незамедлительно увеличивает микровязкость мембран эритроцитов, и через час инкубации полярность поверхности липидного слоя мембран скачкообразно возрастает вследствие деструкции мембраны и попадания туда молекул воды. Микровязкость мембран при этом увеличивается на 60 %, происходит разупорядоченность фосфолипидов. Особая геометрия и высококоразвитая поверхность УНХ способствуют их эффективному связыванию с поверхностью мембран эритроцитов. По-видимому, это приводит к резкому замедлению конформационной подвижности фосфолипидов и снижению латеральной диффузии фосфолипидов. Введение в эритроциты окисленных УНХ также вызывает резкое увеличение микровязкости мембран (эффект 52 %) и разупорядочение фосфолипидов в мембране. Однако через час инкубации наблюдается

некоторая релаксация состояния мембраны, и параметры частично приближаются к норме. Поэтому окисленные УНХ можно считать менее токсичными, чем исходные нанохорны.

Полученные данные позволили связать механизмы цитотоксического действия нанохорнов с их игольчатой формой – снижение латеральной диффузии фосфолипидов поверхности мембран (увеличение микровязкости) при взаимодействии иголок нанотрубок с мембраной, появление молекул воды во внешнем липидном слое мембран и разупорядочение фосфолипидов вследствие взрывления и деструкции мембран конусными иглами нанохорнов.

Введение ДНА во взвесь эритроцитов в концентрации 25 мкг/мл не приводило к каким-либо изменениям микровязкости мембран эритроцитов в пределах ошибки эксперимента. В то же время повышение концентрации ДНА во взвеси эритроцитов до 50 и 75 мкг/мл приводило к заметному уменьшению микровязкости мембран эритроцитов (повышению текучести мембран) на 20 и 28 % соответственно. Увеличение текучести мембран эритроцитов имеет большое значение для организма, т.к. позволяет эритроцитам лучше проникать через тонкие или суженные капилляры и более эффективно питать кислородом ткани и органы организма. Кроме этого увеличение текучести мембран клеток повышает активность мембранных ферментов, что должно приводить к активизации обменных и регуляторных процессов в клетках и в организме в целом. Возможно этим можно объяснить успешное применение ДНА в онкологии, лечении желудочно-кишечного тракта и др.

Таким образом, причина цитотоксичности углеродных наночастиц, за исключением ДНА, в наибольшей степени связана с их размерами и формой.

Вплив вуглецевих наночастинок різної природи на мікров'язкість мембран еритроцитів експериментальних тварин

М.Т. Картель, Л.В. Іванов, А.М. Ляпунов, О.А. Нардід, Я.О. Черкашина, О.В. Щербак,
О.А. Гурова, А.В. Окотруб

*Институт хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна, nikar@kartel.kiev.ua*

*Институт монокристалів Національної академії наук України
пр. Науки 60, Харків, 61001, Україна*

*Институт кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України
вул. Переяславська, 23, Харків, 61015, Україна*

*Харківська зооветеринарна академія
вул. Академічна, 1, смт Мала Данилівка, Харківська обл., 62341, Україна*

*Институт неорганічної хімії ім. А.В. Ніколаєва СБ РАН
пр. Академіка Лаврент'єва, 3, Новосибірськ, 630090, Росія*

Мікров'язкість мембран еритроцитів безпосередньо пов'язана з їхньою цілісністю, порушення якої в присутності сторонніх об'єктів проявляється в різкому підвищенні показника мікров'язкості, що безумовно свідчить про ступінь цитотоксичного впливу об'єктів, що контактують з клітинами живого організму.

Методом спінових зондів проведено порівняльне вивчення впливу ряду вуглецевих наночастинок на мікров'язкість мембран еритроцитів цурів. Встановлено, що присутність окисненого графену (ОГ) у суспензії еритроцитів практично не впливає на показник мікров'язкості мембран. У присутності вуглецевих нанотрубок (УНТ) різної структури при тривалій (24 год) їх інкубації з еритроцитами відзначається збільшення показника мікров'язкості мембран еритроцитів у 1.5–2 рази. Найбільший вплив мають окиснені багатостінні нанотрубки. Менший вплив чинять гідрофобні багатостінні УНТ, а одностінні нанотрубки характеризуються незначним впливом на мембрани. Інкубація еритроцитів з вуглецевими нанохорнами (УНХ) призводить до істотного збільшення мікров'язкості мембран еритроцитів на 60 % і вище; через 1 год інкубації полярність поверхні ліпідного шару мембран стрибкоподібно зростає, мабуть, внаслідок деструкції мембрани і потрапляння туди молекул води, а також розупорядкування фосфоліпідів. Введення наночастинок детонаційного наноалмазу (ДНА) у суспензію еритроцитів в концентрації 25 мкг/мл не робило помітної зміни показника мікров'язкості мембран. Підвищення концентрації ДНА в суспензії еритроцитів до 50 і 75 мкг/мл призводило до зниження показника мікров'язкості мембран еритроцитів (підвищення плинності мембран) відповідно на 20 і 28 %. Таким чином, серед вуглецевих наночастинок цитотоксичність можуть проявляти нанотрубки і нанохорни, що обумовлено, головним чином, їхньою структурою, розмірами і формою.

Ключові слова: наночастинок, спінові зонди, мікров'язкість мембран, графен, нанотрубки, нанохорни, наноалмази, цитотоксичність

The effect of carbon nanoparticles of various nature on the microviscosity of erythrocyte membranes in experimental animals

N.T. Kartel, L.V. Ivanov, A.N. Lyapunov, O.A. Nardid, Ya.O. Cherkashina, E.V. Shcherbak,
O.A. Gurova, A.V. Okotrub

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine, nikar@kartel.kiev.ua*

*Institute of Monocrystals of National Academy of Sciences of Ukraine
60 Nauky Ave., Kharkov, 61001, Ukraine*

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

*Kharkov Veterinary Academy
1 Academic Str., smt Mala Danylivka, Kharkiv region, 62341, Ukraine*

*A.V. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry, SB RAS
3 Academician Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090, Russia*

The microviscosity of erythrocyte membranes is directly related to their integrity, the violation of which in the presence of foreign objects manifests itself in a sharp increase in the microviscosity index, which certainly indicates the degree of cytotoxic effect of objects in contact with cells of a living organism.

Using the spin probe method, a comparative study was made of the effect of a number of carbon nanoparticles on the microviscosity of rat erythrocyte membranes. It has been found that the presence of oxidized graphene (OG) in suspension of red blood cells practically does not affect the microviscosity index of membranes. In the presence of carbon nanotubes (CNTs) of various structures during prolonged (24 h) incubation with erythrocytes, an increase in the microviscosity of erythrocyte membranes is 1.5–2 times. Oxidized multi-walled nanotubes exert the greatest effect. Hydrophobic multi-walled CNTs have a smaller effect, and single-walled nanotubes are characterized by a slight effect on the membranes. Incubation of erythrocytes with carbon nanochorns (CNCh) leads to a significant increase in the microviscosity of erythrocyte membranes by 60 % and higher; after 1 h of incubation, the polarity of the surface of the lipid layer of the membranes increases stepwise, apparently due to the destruction of the membrane and the ingress of water molecules there, as well as the disorder of phospholipids. The introduction of detonation nanodiamond (DND) nanoparticles into a suspension of erythrocytes at a concentration of 25 µg/ml produced no noticeable change in the membrane microviscosity index. An increase in the concentration of DND in suspension of red blood cells to 50 and 75 µg/ml led to a decrease in the microviscosity of erythrocyte membranes (increase in fluidity of the membranes) by 20 and 28 %, respectively. Thus, among carbon nanoparticles, nanotubes and nanochorns can exhibit cytotoxicity, which is mainly due to their structure, size, and shape.

Keywords: nanoparticles spin probes, microviscosity of membranes, graphene, nanotubes, nanochorns, nanodiamonds, cytotoxicity

ЛИТЕРАТУРА

1. Feng L., Wu L., Qu X. New horizons for diagnostics and therapeutic applications of graphene and graphene oxide // *Adv. Mater.* – 2013. – V. 25, N 2. – P. 168–86.
2. Sinha N., Yeow J.T.-W. Carbon nanotubes for biomedical applications // *IEEE Transactions Nanobioscience.* – 2005. – V. 4, N 2. – P. 180–195.
3. Rey D.A., Batt C.A., Miller J.C. Carbon nanotubes in biomedical applications // *Nanotechnology Law @ Business.* – 2006. – V. 3, N 3. – P. 263–292.
4. Yang W., Thordarson P., Gooding J.J. et al. Carbon nanotubes for biological and biomedical application // *Nanotechnology.* – 2007. – V. 18, N 41. – P. 1–12.
5. Яковлев Р.Ю., Соломатин А.С., Леонидов Н.Б. и др. Детонационный наноалмаз – перспективный носитель для создания систем доставки лекарственных веществ // *Российский химический журнал.* – 2012. – Т. 56, № 56. – С. 114–125.
6. Долматов В.Ю. Ультрадисперсные алмазы детонационного синтеза: свойства и применение // *Успехи химии.* – 2001. – Т. 70, № 7. – С. 687–708.
7. Hurt R.H., Monthieux M., Kane A. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue // *Carbon.* – 2006. – V. 44, N 6. – P. 1028–1033.
8. Kartel M.T., Ivanov L.V., Kovalenko S.N., Tereschenko V.P. Carbon nanotubes: biorisks and biodefence // *Biodefence: Advanced Materials and Methods for Health Protection.* – Springer Science+Business Media, 2011. – P. 11–22.
9. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – Москва: Наука, 1974. – 256 с.
10. Берлинера Л. Метод спиновых меток. Теория и применения. – Москва: Мир, 1979. – 639 с.
11. Картель Н.Т., Иванов Л.В., Карачевцев В.А. и др. Исследование взаимодействия окисленного графена с мембранами эритроцитов и белками плазмы крови крыс методом спиновых зондов // *Доповіді НАН України.* – 2017. – № 8. – С. 71–79.
12. Окотруб А.В., Шевцов Ю.В., Насонова Л.И. и др. Синтез монослойных замкнутых углеродных частиц в электродуговом разряде // *Неорганические материалы.* – 1996. – Т. 32, № 8. – С. 974–978.
13. Гурова О.А., Омельянчук Л.В., Окотруб А.В. и др. Синтез и модификация структуры углеродных нанохорнов для применения в гипертермии // *Журнал структурной химии.* – 2017. – Т. 58, № 6. – С. 1253–1260.
14. Porter A.E., Gass M., Muller K. et al. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells // *Nat. Nanotechnol.* – 2007. – V. 2, N 11. – P. 713–717.

15. Картель Н.Т., Иванов Л.В., Ляпунов А.Н. и др. Оценка влияния углеродных нанотрубок на микровязкость мембран эритроцитов // Доповіді НАН України. – 2015. – № 3. – С. 114–121.
16. Картель Н.Т., Иванов Л.В., Ляпунов А.Н. и др. Оценка влияния углеродных нанохорнов на микровязкость мембран эритроцитов и белки плазмы крови крыс методом спиновых зондов // Доповіді НАН України. – 2017. – № 12. – С. 73–82.
17. Miyawaki J., Yudasaka M., Azami T. et al. Toxicity of single-walled carbon nanohorns // ACS Nano. – 2008. – V. 2, N 2. – P. 213–226.

REFERENCES

1. Feng L., Wu L., Qu X. New horizons for diagnostics and therapeutic applications of graphene and graphene oxide. *Adv. Mater.* 2013. **25**(2): 168.
2. Sinha N., Yeow J.T.-W. Carbon nanotubes for biomedical applications. *IEEE Transactions Nanobioscience.* 2005. **4**(2): 180.
3. Rey D.A., Batt C.A., Miller J.C. Carbon nanotubes in biomedical applications. *Nanotechnology Law @ Business.* 2006. **3**(3): 263.
4. Yang W., Thordarson P., Gooding J.J., Ringer S. Carbon nanotubes for biological and biomedical application. *Nanotechnology.* 2007. **18**(41): 1.
5. Yakovlev R.Yu., Solomatin A.S., Leonidov N.B., Kulakova I.I., Lisichkin G.V. Detonation nanodiamond – a promising carrier for the creation of drug delivery systems. *Russ. Chem. J.* 2012. **56**(56): 114. [in Russian].
6. Dolmatov V.Yu. Detonation synthesis ultradispersed diamonds: properties and applications. *Russ. Chem. Rev.* 2001. **70**(7): 607. [in Russian].
7. Hurt R.H., Monthieux M., Kane A. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. *Carbon.* 2006. **44**(6): 1028.
8. Kartel M.T., Ivanov L.V., Kovalenko S.N., Tereschenko V.P. Carbon nanotubes: biorisks and biodefence. In: *Biodefence: Advanced Materials and Methods for Health Protection.* (Springer Science+Business Media, 2011). P. 11–22.
9. Liechtenstein G.I. *The Method of Spin Labels in Molecular Biology.* (Moscow: Science, 1974). [in Russian].
10. Berliner L. *The Method of Spin Labels. Theory and Applications.* (Moscow: Mir, 1979). [in Russian].
11. Kartel N.T., Ivanov L.V., Karachevtsev V.A., Lyapunov A.N., Nardid O.A., Cherkashina Ya.O., Leontiev V.S., Ivanov A.Yu. Estimation of the interaction of oxidized graphene with rat's erythrocyte membranes and blood plasma proteins by the method of spin probes. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2017. **8**: 71. [in Russian].
12. Okotrub A.V., Shevtsov Yu.V., Nasonova L.I. Synthesis of monolayered closed carbon particles in electric arc discharge. *Inorganic Materials.* 1996. **32**(8): 974. [in Russian].
13. Gurova O.A., Omelyanchuk L.V., Dubatolova T.D., Antokhin E.I., Eliseev V.S., Yushina I.V., Okotrub A.V. Synthesis and modification of carbon nanohorns structure for hyperthermic application. *Journal of Structural Chemistry.* 2017. **58**(6): 1253. [in Russian].
14. Porter A.E., Gass M., Muller K., Skepper J.N., Midgley P.A., Welland M. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nat. Nanotechnol.* 2007. **2**(11): 713.
15. Kartel N.T., Ivanov L.V., Lyapunov A.N., Nardid O.A., Okotrub A.V., Kirilyuk I.A., Cherkashina Ya.O. Estimation of the effect of carbon nanotubes on the microviscosity of erythrocyte membranes. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2015. **3**: 114. [in Russian].
16. Kartel N.T., Ivanov L.V., Lyapunov A.N., Nardid O.A., Cherkashina Ya.O., Gurova O.A., Ocotrub A.V. Assessment of the effect of carbon nanohorns on the microviscosity of membranes of erythrocytes and rat plasma proteins by the method of spin probes. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine.* 2017. **12**: 73. [in Russian].
17. Miyawaki J., Yudasaka M., Azami T., Kubo Y., Iijima S. Toxicity of single-walled carbon nanohorns. *ACS Nano.* 2008. **2**(2): 213.

Получена 02.07.2019, принята 20.08.2019