

ДОСТАВКА ЛИПОФИЛЬНЫХ СПИНОВЫХ ЗОНДОВ УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ В ЭРИТРОЦИТЫ И ПЛАЗМУ КРОВИ

Л.В. Иванов¹, А.Н. Ляпунов², Н.Т. Картель¹, О.А. Нардид⁵, А.В. Окотруб³,
И.А. Кирилук⁴, Я.О. Черкашина⁵

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

²Институт монокристаллов НАН Украины, Харьков;

³Институт неорганической химии СО РАН, Новосибирск;

⁴Новосибирский государственный университет, Новосибирск;

⁵Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

С использованием метода электронного парамагнитного резонанса проведена оценка связывания (нековалентной сорбции) ряда спиновых зондов, представляющих собой парамагнитные модели липофильных физиологически активных веществ, углеродными нанотрубками различной структуры, а также особенностей перехода (трансдиффузии) зондов с поверхности нанотрубок на белки плазмы и мембраны эритроцитов при контакте (инкубации) с компонентами крови. Показано, что липофильные зонды, не имеющие ионогенных групп, образуют устойчивые комплексы с одно- и многостенными углеродными нанотрубками, тогда как зонд с четвертичной аммониевой группой на трубках практически не сорбируется. При контакте комплексов «зонд-нанотрубка» с плазмой и эритроцитами крови экспериментальных животных в течение нескольких часов наблюдается десорбция зондов (до 15%) за счет их взаимодействия с белками плазмы, а также прогрессирующее проникновение в билипидный слой мембраны эритроцитов. Продемонстрировано, что метод спиновых зондов позволяет оценивать эффективность нанотрубок в качестве средств доставки целевых веществ к клеткам-мишеням и определять локализацию зондов в мембранах и внутриклеточном пространстве.

Углеродные нанотрубки (УНТ) рассматриваются как перспективное средство доставки лекарственных препаратов к клеткам-мишеням различных органов и тканей живых организмов. Благодаря химической инертности и стабильности УНТ могут находиться в организме животных и людей без изменений на протяжении длительного времени, а большая удельная поверхность (до 2000 м²/г и более) и возможность их химической модификации обеспечивают способность сорбировать значительные количества веществ различной природы. Важной особенностью углеродных нанотрубок является их способность проникать внутрь клеток (трансмембранная диффузия), в том числе онкологических новообразований, через систему кровеносных сосудов, снабжающих кровью соответствующие органы [1–5]. Отмеченные свойства предопределяют актуальность исследования особенностей связывания различных веществ с УНТ, разработки способов их функционализации с целью повышения биосовместимости и уменьшения цитотоксичности, определения фармакокинетики физиологически активных веществ (ФАВ), связанных с нанотрубками, а также создания новых систем «адресной» доставки ФАВ на основе УНТ.

Анализ литературы по связыванию ФАВ с УНТ показывает, что лишь немногие исследования посвящены изучению взаимодействия их соответствующих комплексов с клетками. Как правило, это были клетки различных опухолей [5–7]. Вместе с тем, при инкубации таких комплексов с клетками органов и тканей *in vitro* можно оценить время удержания вещества на поверхности нанотрубок в присутствии биообъекта и дать прогноз относительно эффективности такого комплекса *in vivo*, как системы адресной доставки лекарственных веществ в организме, избежав проведения дорогих и трудоемких фармакокинетических исследований. Такие исследования требуют применения спектральных методов, позволяющих в сложной системе «вещество – нанотрубки – клетки»

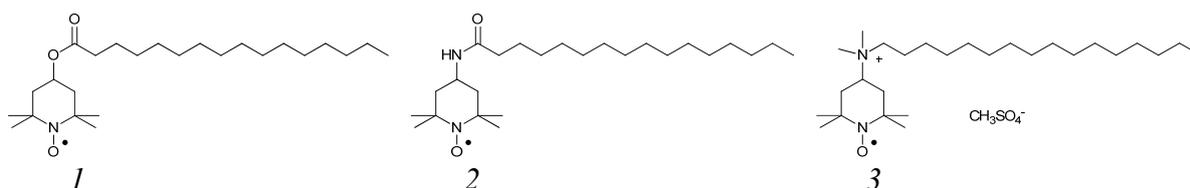
по каким-либо характеристическим спектрам разделять информацию о веществе, связанном и не связанном с нанотрубками, а также находящемся на мембране или в цитозоле клеток.

Для изучения сорбции веществ на поверхности УНТ можно использовать метод спиновых зондов [8–10]. В этом методе просто и наглядно фиксируется изменение вращательной броуновской подвижности спин-меченых молекул при сорбции на трубках и десорбции с их поверхности, поскольку спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) свободных радикалов очень чувствительны к малейшим изменениям их подвижности в изучаемой среде. Мы предположили возможность использования метода спиновых зондов для оценки удерживания (нековалентной сорбции и десорбции) зондов, являющихся спин-мечеными (парамагнитными) моделями комплексов «УНТ–ФАВ» различной структуры. Метод позволяет по форме линий и параметрам спектров ЭПР не только быстро оценить сам факт сорбции спин-меченых веществ на поверхности нанотрубок, но и различать липофильные зонды, достаточно сильно связанные с гидрофобной поверхностью нанотрубок, а также зонды, находящиеся в воде, плазме или липидном бислое мембран клеток. При этом открывается также возможность изучать кинетику процесса трансдиффузии веществ с поверхности УНТ на мембраны клеток при их контакте, оценивать время удержания ФАВ нанотрубками в присутствии клеток. Последнее обстоятельство является исключительно важным для характеристики УНТ, как системы доставки целевых продуктов в клетки-мишени органов и тканей.

Целью работы явилось оценка связывания (нековалентной сорбции) ряда спиновых зондов, представляющих собою парамагнитные модели ФАВ, поверхностью углеродных нанотрубок различной структуры, а также особенностей перехода (трансдиффузии) зондов с поверхности нанотрубок на белки плазмы и мембраны эритроцитов в условиях контакта (инкубации) с компонентами крови.

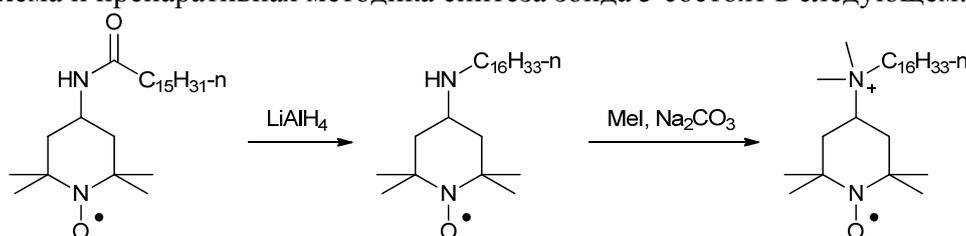
Материалы и методы

В качестве парамагнитных моделей ФАВ, способных связываться с нанотрубками в супрамолекулярные комплексы, использовали зонды 1–3:



Зонды 1 и 2, полученные по описанным ранее методикам [11], являются полностью гидрофобными, так как выполнены на основе насыщенной углеводородной цепи пальмитиновой кислоты. Зонд 3, полученный из зонда 2, обладает четвертичным азотом, положительный заряд которого обеспечивает зонду свойства ионогенного поверхностно-активного вещества (ПАВ).

Схема и препаративная методика синтеза зонда 3 состоят в следующем:



1,5 г (3,66 ммоль) 4-пальмитоиламидо-ТЕМПО (зонд 2) растворяли в 20 мл сухого ТГФ, прибавляли по каплям к кипящему раствору 1,35 г (36,6 ммоль) LiAlH_4 в 40 мл ТГФ. Реакционную массу кипятили с обратным холодильником 10 ч, после чего избыток восстановителя осторожно разлагали этанолом, а затем насыщенным водным раствором NaCl (до прекращения экзотермической реакции). Полученную массу упаривали досуха при пониженном давлении, остаток растирали с диэтиловым эфиром, осадок отфильтровывали, промывали эфиром. К эфирному раствору прибавляли 3 г диоксида марганца (катализатор), перемешивали 0,5 ч, осадок отфильтровывали, эфир отгоняли при пониженном давлении. Полученный остаток подвергали хроматографическому анализу на колонке с силикагелем, элюент хлороформ – этилацетат (1:1). Продукт идентифицирован как 4-гексадециламино-ТЕМПО, выход 700 мг (48%), представляет собою маслянистую жидкость розового цвета, кристаллизующуюся в холодильнике. В ИК - спектрах характерны следующие полосы, см^{-1} : 3425, 2953, 2924, 2853, 1468, 1370, 1362, 1244, 1180, 1119, 1067, 968, 719. Продукт неустойчив (при комнатной температуре постепенно разлагается), поэтому его сразу использовали в следующей стадии.

В раствор 400 мг (1 ммоль) полученного продукта в 5 мл сухого хлороформа прибавляли 1 г безводного карбоната натрия и 1 мл (16 ммоль) йодистого метила, а затем перемешивали в плотно закупоренном сосуде при комнатной температуре 48 ч. Осадок отфильтровывали, растворитель отгоняли при пониженном давлении. Образовавшийся остаток подвергали хроматографическому анализу на колонке с силикагелем, элюент хлороформ – этанол (5:1). Выход продукта 350 мг (60%). Представляет собой кристаллический порошок розового цвета с температурой плавления $138\text{ }^\circ\text{C}$ (с разложением). В ИК - спектрах характерны следующие полосы, см^{-1} : 2994, 2954, 2920, 2851, 1470, 1393, 1361, 1339, 1244, 1186, 1103, 983, 893, 719, 671, 570. Элементный состав, % мас.: С - 58,83; Н - 10,45; N - 4,90; I - 22,67, что близко к расчетному составу для $\text{C}_{27}\text{H}_{56}\text{N}_2\text{OI}$: С - 58,79; Н - 10,23; N - 5,08; I - 23,0 % мас. Продукт идентифицирован как 4-(N,N-диметил-N-гексадециламмоний)-ТЕМПО (зонд 3).

Введение зондов 1–3 в водную суспензию УНТ осуществляли добавлением концентрированного раствора зонда в ДМСО таким образом, чтобы конечная концентрация ДМСО в суспензии составляла не более 0,5–1%.

Регистрацию спектров ЭПР осуществляли на радиоспектрометре «ESR Spectrometer CMS8400». Время корреляции спинового зонда определяется из спектров ЭПР по следующим формулам [8]:

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

$$1/\tau_{c(-1)} = 3,6 \cdot 10^9 / [(\sqrt{h_0/h_{-1}} - 1)\Delta H_0], \text{ с}^{-1} \quad (2)$$

$1/2\pi\tau = \nu$ – величина, условно названная «частотой вращения» радикала. На практике для оценки вращательной подвижности спинового зонда в средах используют параметры h_0/h_{+1} и h_0/h_{-1} спектров ЭПР (рис. 1), пропорциональные τ_c .

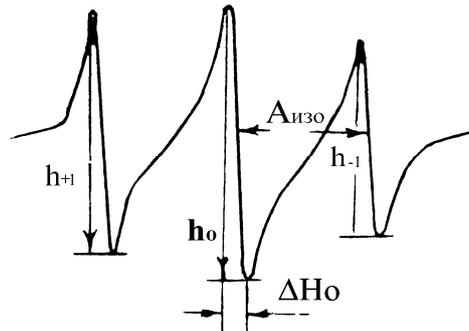


Рис. 1. Типичный спектр ЭПР спинового зонда – иминоксильного радикала в водно-глицериновой среде: ΔH_0 – ширина центральной компоненты, h_0 , h_{+1} и h_{-1} – интенсивности компонентов спектра ЭПР с соответствующим магнитным квантовым числом ядра ^{14}N ($M = 0, +1, -1$); $A_{\text{изо}}$ – изотропная константа.

Для оценки локализации и доступности зонда к воде в том случае, когда он связан с нанотрубкой или находится в мембране клеток, в изучаемую водную суспензию вводили парамагнитный «уширитель» спектров ЭПР – $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Этот реагент уширяет спектр при доступности иминоксильного фрагмента зонда к воде.

В работе использованы два типа УНТ.

- Одностенные нанотрубки ОСУНТ. Содержание нанотрубок $\sim 70\%$. Материал получен на катализаторе из металлического железа с добавками иных d- и f- металлов. Деминерализация не проводилась. Синтез ОСУНТ проведен в Институте неорганической химии СО РАН, Новосибирск [12].

- Многостенные нанотрубки МСУНТ. Содержание нанотрубок $>95\%$. Материал получен методом CVD при пиролизе пропилена на смешанном оксидном Al-Fe-Mo катализаторе аэрозольного типа. Продукт деминерализован, зольность $<0,4\%$. Синтез МСУНТ проведен в Институте химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины совместно с предприятием «ТМСпецмаш», Киев [13].

Для получения комплексов нанотрубок с липофильными зондами водную суспензию исследуемых нанотрубок (концентрация 0,8 – 1,0 мг/мл) с зондом озвучивали ультразвуком в течение 30 мин на установке Ultrasonic Cleaner.

Эритроцитарную массу получали из крови крыс самцов путем трехкратной отмывки физиологическим раствором (0,9% хлорида натрия), приготовленном на натрий-фосфатном буфере (5 ммоль/л, pH 7,2–7,4), с последующим центрифугированием в течение 20 мин при скорости 3000 об/мин.

Надосадок после первого центрифугирования использовали в качестве плазмы.

Для изучения процесса десорбции спиновых зондов с поверхности нанотрубок на биообъекты водную взвесь нанотрубок смешивали с плазмой или эритроцитарной массой в соотношении 1:1.

Результаты и обсуждение

Спиновые зонды – свободные радикалы иминоксильного типа (торговая марка ТЕМПО), как правило, растворимы в воде и при умеренных концентрациях дают триплетный спектр ЭПР из узких линий (рис. 1). Зонды не взаимодействуют друг с другом и осуществляют быструю вращательную броуновскую диффузию в воде. Гидрофобные зонды 1 и 2 практически не растворимы в воде, хорошо растворимы в полярных и неполярных органических растворителях, поэтому растворы этих зондов в заметных концентрациях возможны лишь в водно-органических смесях. На рис. 2 приведён спектр ЭПР зонда 1, полученного при добавлении концентрированного раствора зонда в

ДМСО в физиологический раствор (концентрация зонда в жидкой фазе составила $2 \cdot 10^{-4}$ мг/л). Уширенный синглет характерен для спектров жидких индивидуальных нитроксильных радикалов или их концентрированных растворов, в которых происходят быстрые обменные взаимодействия между нитроксильными фрагментами. В полученном спектре нет узких линий триплета. Добавление феррицианида не приводит к изменению спектра, что свидетельствует, скорее всего, о выделении радикала в отдельную фазу эмульсии.

Для полного связывания липофильных спиновых зондов 1 и 2 нанотрубками требуется определенный избыток нанотрубок в исходной водной суспензии. Эксперименты показали, что это происходит при концентрации нанотрубок 0,8–1,0 мг/мл и концентрации зондов $2 \cdot 10^{-4}$ мг/л. Нижняя концентрация зонда лимитировалась качеством записи широких сигналов ЭПР. При концентрациях нанотрубок 0,1–0,2 мкг/мл в водной суспензии наблюдается неполная сорбция зондов на поверхности УНТ.

Использование избытка нанотрубок для полного связывания зонда в водных суспензиях позволило по спектрам ЭПР однозначно идентифицировать адсорбированные липофильные зонды 1 и 2 на поверхности УНТ (рис. 2 б, в, г) и изучать кинетику десорбции зондов по появляющимся триплетам с более узкими линиями на фоне широких линий спектра. Для адсорбированного на поверхности УНТ зонда 1, вследствие диполь-дипольных взаимодействий, характерен триплет с очень широкими линиями. Радикальные частицы зонда из кластеров эмульсии переходят на гидрофобную поверхность нанотрубок, где они в определенной мере «индивидуализируются» и между ними уже нет обменного спин-спинового взаимодействия, как это было в кластере. Поскольку в спектре ЭПР исчезает доминирующий синглет, а в системе, кроме зонда, имеется лишь один гидрофобный объект – поверхность нанотрубок, можно констатировать, что происходит полное связывание липофильного зонда с поверхностью УНТ. Дополнительное введение уширителя – феррицианида калия – практически не влияло на спектры ЭПР зондов 1 и 2, связанных с поверхностью нанотрубок, так как зонды в свободном состоянии в водной фазе отсутствуют, а линии спектров ЭПР связанных зондов уже достаточно сильно уширены.

Спектр ЭПР зонда 2 в водной суспензии ОСУНТ (рис. 2 г) однозначно свидетельствует об адсорбционном удерживании зонда на поверхности нанотрубок. Одновременно наблюдается большое уширение линий (диполь-дипольные взаимодействия) и большое отношение интенсивности центральной и высокополевой компонент (сильная заторможенность вращательной подвижности зонда).

Спиновый зонд 3 представляет собой ионогенное ПАВ; он содержит в своём составе четвертичный аммониевый фрагмент и липофильную алкильную цепь. Имеет достаточно хорошую растворимость в воде. Спектр ЭПР этого зонда в физиологическом растворе представляет собой триплет с узкими линиями равной интенсивности (рис. 3 а), что соответствует образованию истинного (гомогенного) раствора. Добавка водной суспензии ОСУНТ не влияет на форму спектра ЭПР этого зонда. Добавление раствора феррицианида калия к суспензии нанотрубок с зондом 3 приводит к уширению линий спектра и понижению их интенсивности до нуля, по-видимому, из-за обменных взаимодействий (рис. 3 б). Одновременно это указывает на практически полное отсутствие удерживания этого зонда на поверхности нанотрубок и локализацию нитроксильного фрагмента в водной фазе. По-видимому, наличие высокого заряда в структуре этого радикального продукта приводит к формированию устойчивой сольватной оболочки в водном растворе, что препятствует сорбции всего зонда на поверхности нанотрубок.

Полученный результат о незначительной сорбции спин-меченого ионогенного ПАВ (зонд 3) представляется интересным, поскольку в литературе имеются сведения о том, что неионогенные ПАВ подобного строения (например, Твин 80), а также конъю-

гаты жирных кислот с полиэтиленгликолем достаточно хорошо связываются с поверхностью нанотрубок. При этом алкильный «хвост» кислоты укладывается на поверхности УНТ, а гидрофильные фрагменты направлены в воду [14].

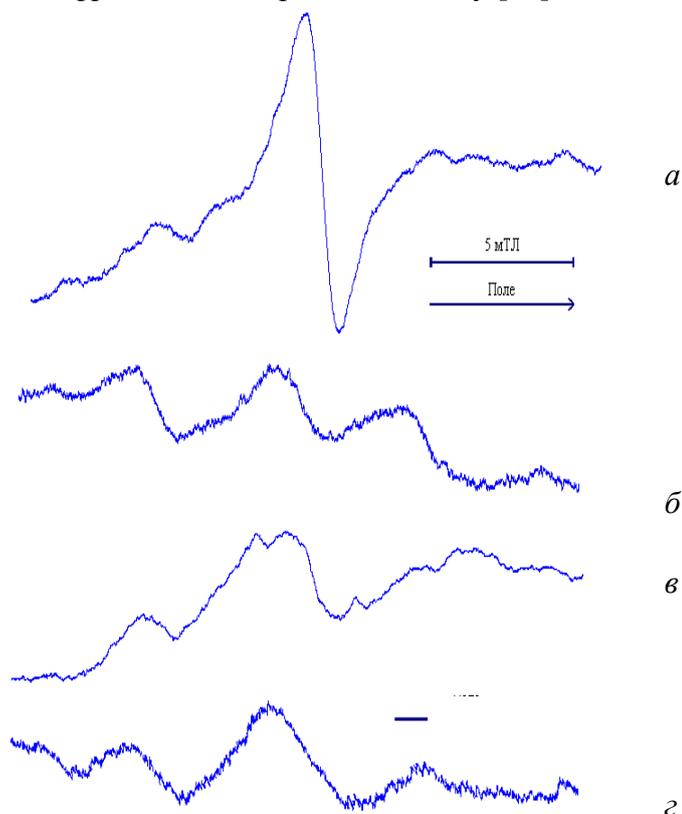


Рис. 2. Спектры ЭПР спинового зонда 1: *а* – в физиологическом растворе (0,9% NaCl), *б* – в водной суспензии ОСУНТ, *в* – в водной суспензии МСУНТ, *г* – спинового зонда 2 в водной суспензии ОСУНТ.

На рис. 2 *в* представлен спектр ЭПР липофильного зонда 1 в водной суспензии МСУНТ. Суспензия подвергалась дополнительной ультразвуковой обработке в течение 1 ч для получения устойчивых комплексов зонда с нанотрубками. Отметим, что МСУНТ представляет суммарную фракцию трубок различного размера, что, по-видимому, отражается и на спектре ЭПР зонда 1. Спектр ЭПР свидетельствует об иммобилизации большей части зонда 1 на поверхности нанотрубок, однако сложный характер этого спектра указывает на неоднородность распределения зонда, возможно некоторой части в виде кластеров.

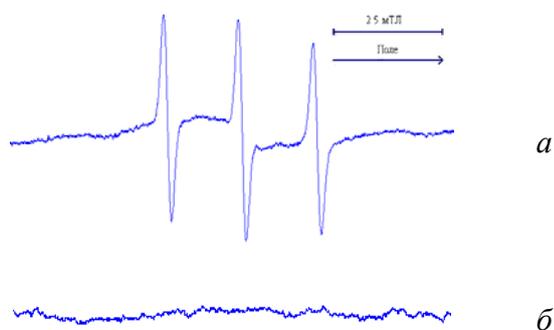


Рис. 3. Спектры ЭПР зонда 3: *а* – в физиологическом растворе, *б* – в водной суспензии ОСУНТ в присутствии феррицианида калия (0,1 М).

В работе [15] показано, что при введении ОСУНТ или МСУНТ в плазму крови происходит эффективная сорбция белков плазмы на поверхности нанотрубок, в результате чего смачиваемость и биосовместимость нанотрубок увеличивается. С помощью радиоизотопного метода установлено, что с нанотрубками связываются сывороточный альбумин, фибриноген и несколько аполипопротеинов – АІ, ВГП и С-ІІІ. Известно также, что при внутривенном введении животным комплексов УНТ с липофильными ФАВ наблюдается десорбция иммобилизованных веществ с поверхности нанотрубок в кровь вследствие их взаимодействия с компонентами крови.

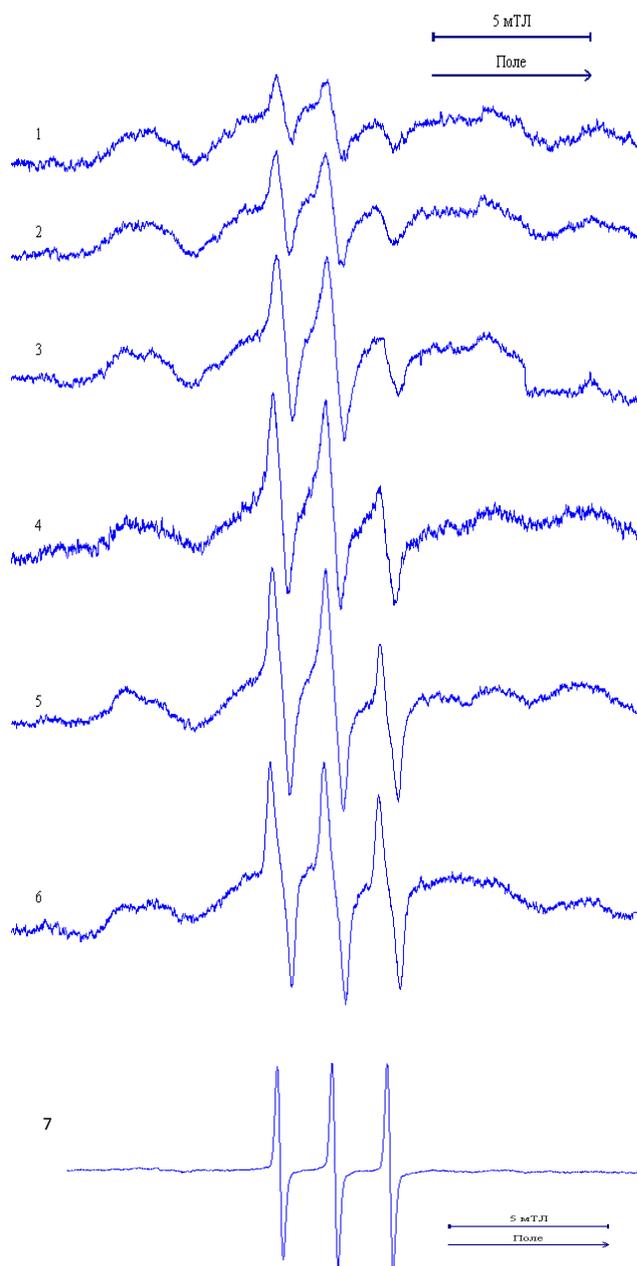


Рис. 4. Спектры ЭПР комплекса ОСУНТ-зонд **1** в разные моменты времени инкубации с плазмой при 24 °С: 1 – 15 мин, 2 – 30 мин, 3 – 1 ч, 4 – 2 ч, 5 – 5 ч, 6 – 7 ч, 7 – 24 ч.

Для моделирования этого процесса *in vitro* мы изучали изменения в спектрах ЭПР связанных с УНТ спиновых зондов **1** и **2** во времени при контакте этих комплексов с плазмой и эритроцитами крови крыс. На рис. 4 представлены спектры ЭПР ком-

плекса ОСУНТ– зонд *I* в зависимости от времени его инкубации с плазмой крови. Видно, что с первых минут инкубации в спектре, помимо трех широких линий, соответствующих связанному с поверхностью зонду, появляется более узкий сигнал, принадлежащий, по-видимому, «заторможенному» зонду, локализованному в гидрофобных участках белков плазмы. К таким белкам относят сывороточный альбумин и липопротеины. Их способность локализовать в своих гидрофобных полостях спин-меченые жирные кислоты экспериментально продемонстрировано в [16].

Примечательно, что, начиная со второго часа после инкубации комплекса ОСУНТ–зонд *I* с плазмой (рис. 4), высокополевая компонента h_{-1} узкого триплета значительно сужается, а её интенсивность возрастает. Через 5–7 ч «заторможенный» триплет преобразуется в сигнал из узких линий, что указывает на резкое увеличение вращательной диффузии зонда. Через 24 ч после начала инкубации спектр ЭПР полностью представляется узким триплетом. Дополнительное введение в систему феррицианида приводит к полному исчезновению узкого триплета в спектре, что свидетельствует о нахождении зонда в электролитном окружении плазмы.

Мы предположили, что зонд *I* в плазме неустойчив и может под влиянием ее ферментов претерпевать гидролиз (по эфирной группе) с высвобождением водорастворимого радикала 4-гидрокси-ТЕМПО (ТЕМПОЛ). Для проверки этого предположения зонд *I* проинкубировали с чистой плазмой в течение 24 ч. Кинетика изменения спектров ЭПР зонда *I* в чистой плазме представлена на рис. 5.

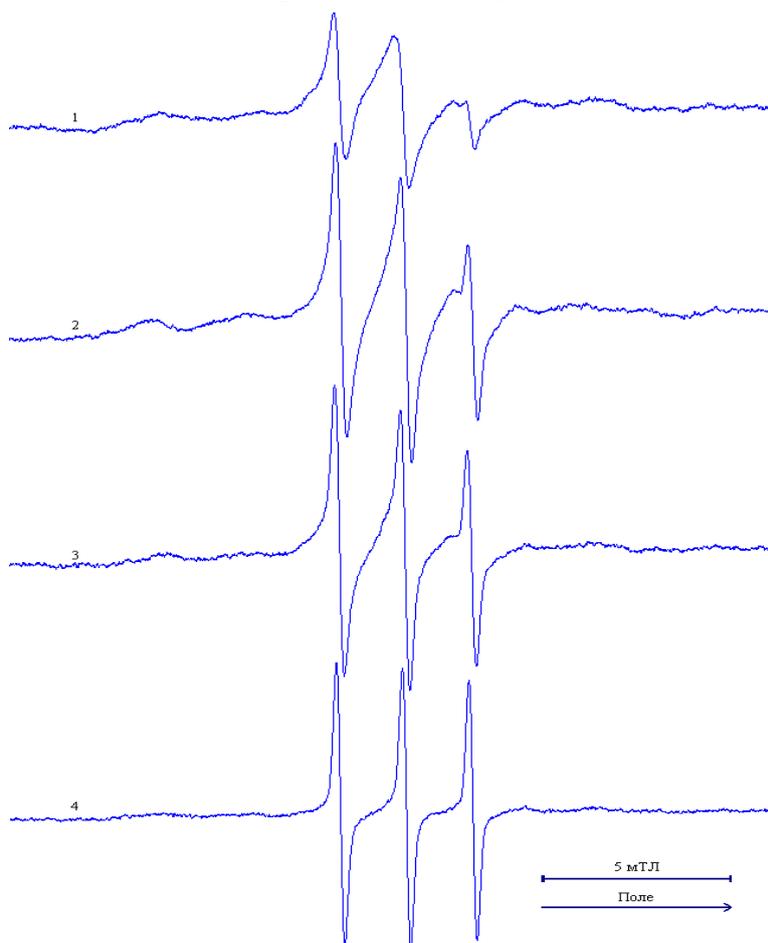


Рис. 5. Спектры ЭПР зонда *I* в разные промежутки времени инкубации с плазмой при 24 °С: 1 – 1 ч, 2 – 4 ч, 3 – 8 ч, 4 – 24 ч.

Контрольный эксперимент с плазмой подтвердил предположение о существовании двух параллельных процессов при контакте комплекса ОСУНТ–зонд 1 с плазмой – процесса десорбции зонда в гидрофобные полости белков плазмы и процесса медленного его гидролиза в течение суток с высвобождением водорастворимого радикала ТЕМПОЛ. Сравнительный анализ ширины и интенсивности широкого триплета, соответствующего связанному с нанотрубками зонду, и сравнительно узкого «заторможенного» триплета, соответствующего зонду на белках плазмы, показал, что десорбция зонда с поверхности нанотрубок в плазму в течение первого часа составляет около 15%.

Десорбция зонда 2 с поверхности ОСУНТ в плазму имеет свои особенности. В отличие от зонда 1 зонд 2 имеет в качестве связывающего мостика пептидную группу, которая достаточно устойчива к действию гидролитических ферментов. Поэтому зонд 2 устойчив к гидролизу в среде плазмы крови. Десорбция зонда с поверхности нанотрубок также начинается с первых минут инкубации комплекса с плазмой и нарастает со временем, однако существенно медленнее, чем в случае зонда 1 (рис. 6). Небольшое количество зонда 2 переходит в гидрофобные участки белков плазмы в течение 24 ч, что подтверждается сильно «заторможенным» сигналом ЭПР от зонда в течение длительного времени. Основная часть зонда 2 остается на поверхности ОСУНТ (большая интенсивность низкополевой компоненты широкого триплета). Спектры ЭПР зонда 2 в чистой плазме подтвердили локализацию зонда в белках после его десорбции с поверхности нанотрубок.

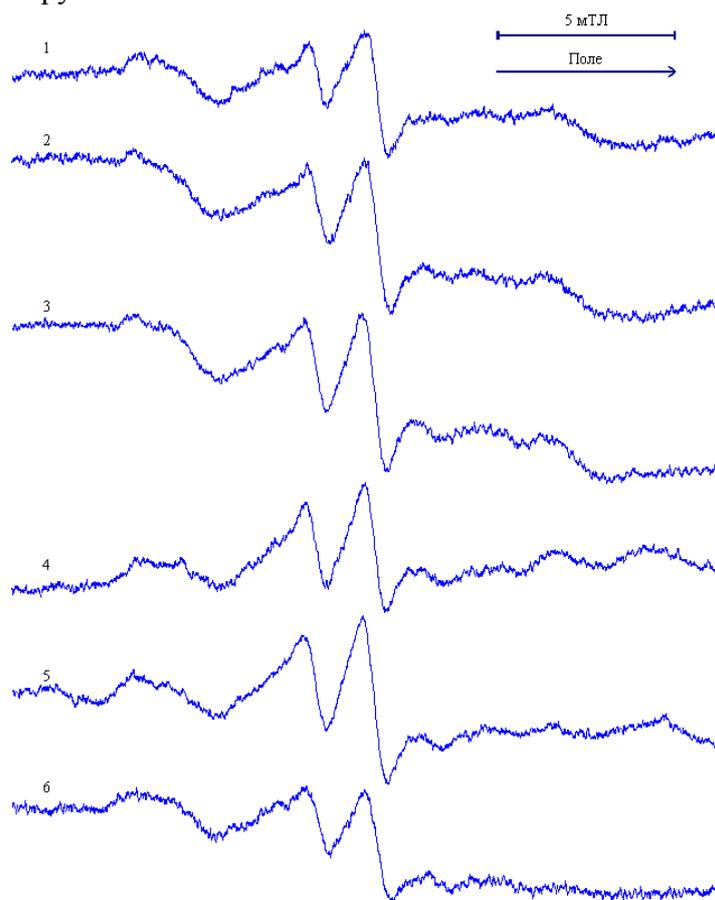


Рис. 6. Кинетика изменения спектров ЭПР в процессе десорбции зонда 2 при инкубации комплекса ОСУНТ–зонд 2 с плазмой при 24 °С: 1 – 15 мин, 2 – 30 мин, 3 – 1 ч, 4 – 2 ч, 5 – 4 ч, 6 – 24 ч).

Из полученных результатов следует, что нанотрубки могут быть эффективной системой доставки липофильных ФАВ при внутривенном введении комплекса «УНТ–ФАВ» в организм, так как подавляющая часть веществ в первые несколько часов, когда происходит распределение основной массы вещества по органам и тканям, находится в комплексе с нанотрубками. Небольшая часть вещества переносится белками плазмы.

Процесс десорбции зондов 1 и 2 с поверхности УНТ в присутствии эритроцитов отличается от десорбции этих зондов в плазму. В течение первых часов в спектре ЭПР на фоне трех широких линий от зонда 2, сорбированного на ОСУНТ, в центре спектра появляется «заторможенный» триплет от зонда, находящегося в мембране эритроцитов, который с течением времени практически не меняется (рис. 7 а, б). Интенсивность сигнала ЭПР зонда 2 в эритроцитах невелика, а высокополевая компонента спектра h_{-1} зонда в мембране эритроцитов (рис. 7 в) не просматривается из-за наложения широких линий триплета от связанного с нанотрубкой зонда. Таким образом, основная часть зонда 2 находится на поверхности нанотрубок.

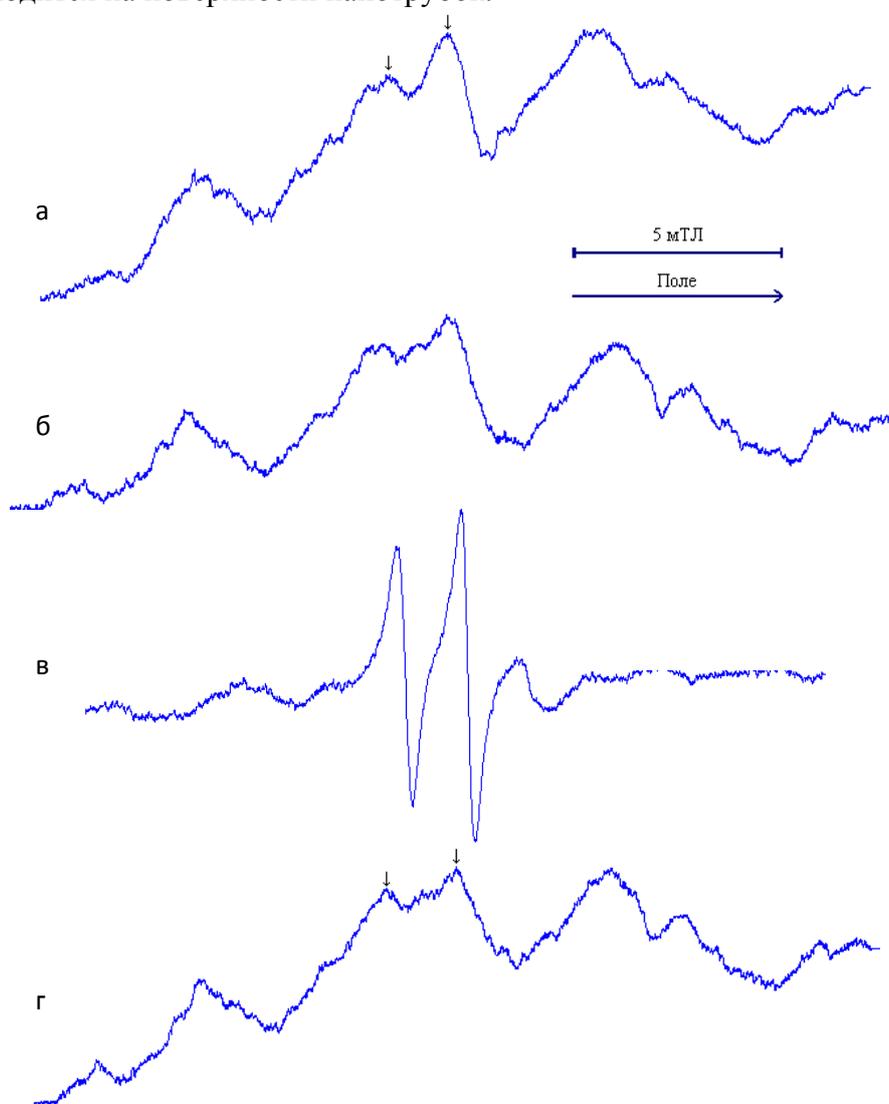


Рис. 7. Спектры ЭПР: комплекса ОСУНТ–зонд 2 после инкубации во взвеси эритроцитов в фосфатном буфере при 24 °С в течение 2 ч (а) и 3 ч (б); зонда 2 во взвеси эритроцитов в фосфатном буфере при 24 °С (в); комплекса ОСУНТ–зонд 1 после инкубации во взвеси эритроцитов в фосфатном буфере при 24 °С в течение 3 ч (г).

Похожие спектры ЭПР наблюдаются и в первые часы после инкубации зонда 1 с эритроцитами (см. рис. 7 з). Характер спектра и динамика изменений свидетельствуют о медленной диффузии зонда 1 с поверхности ОСУНТ в липидный бислой мембран эритроцитов.

Полученные данные показали, что десорбция липофильных спиновых зондов с поверхности нанотрубок в кровь является медленным процессом, определяемая, главным образом, их трансдиффузией в гидрофобные участки белков плазмы и липидный бислой мембран эритроцитов в начальный период после попадания комплекса «УНТ–зонд» в кровь. При этом скорость перехода липофильных зондов в липидный бислой мембран эритроцитов значительно ниже, чем скорость их десорбции в плазму. Очевидно, что взаимодействие зондов 1 и 2 с белками плазмы способствует более быстрой десорбции их с поверхности нанотрубок.

Изучить кинетику десорбции липофильных зондов 1 и 2 с поверхности МСУНТ в плазму или эритроциты не представлялось возможным ввиду неоднородности образцов, поэтому получаемые спектры ЭПР для различных состояний зонда не удается однозначно интерпретировать.

Выводы

Липофильные зонды 1 и 2 образуют устойчивые комплексы с одностенными и многостенными нанотрубками. Способность сорбировать липофильные вещества на гидрофобной поверхности выше у одностенных нанотрубок, чем у многостенных. Зонд 3, являющийся одновременно ионогенным ПАВ, несмотря на наличие в структуре алкильной цепи не связывается с нанотрубками из-за положительного заряда на атоме азота и образования вокруг него сольватной оболочки.

Метод спиновых зондов дает разнообразную информацию о процессах связывания различных липофильных веществ с поверхностью нанотрубок различной структуры и может быть полезен для сравнительной оценки новых УНТ или иных наночастиц, как систем доставки липофильных ФАВ. Полезная информация может быть получена и при функционализации УНТ, поскольку спиновые зонды весьма чувствительны к изменению заряда и полярности поверхности нанотрубок при их химической модификации.

При введении комплексов нанотрубок с липофильными зондами в плазму с первых минут происходит медленная десорбция зондов с поверхности УНТ в гидрофобные полости макромолекул белков плазмы. В первые несколько часов большая часть зондов остается на нанотрубках, а доля десорбированных частиц в плазму составляет около 15%.

Десорбция липофильных зондов в присутствии суспензии эритроцитов в буферном растворе происходит медленнее, чем в присутствии плазмы крови, причём концентрация зондов в мембранах достигает максимума уже через 2–3 часа и со временем не увеличивается.

Таким образом, метод спиновых зондов может успешно использоваться для оценки эффективности УНТ различной структуры в качестве средств доставки ФАВ в клетки-мишени органов и тканей. Метод позволяет оценивать не только процессы десорбции спин-меченых веществ с поверхности УНТ в присутствии клеток, но и определять их локализацию в мембранах и внутриклеточном пространстве.

Литература

1. Kateb B., Yamamoto V., Alizadeh D., Zhang L., Manohara H.M., Bronikowski M.J., Badie B. Multi-walled carbon nanotube (MWCNT) synthesis, preparation, labeling, and

- functionalization // *Immunotherapy of Cancer, Methods in Molecular Biology*. – 2010. – No 651. – P. 307–317.
2. Ting G., Chang C.-H., Wang H. Cancer nanotargeted radiopharmaceutical for tumor imaging and therapy // *Anti-Cancer Researches*. – 2009. – No 29. – P. 4107–4118.
 3. Pastorin G., Wu W., Wieckowski S., Briand J.P., Kostarelos K., Prato M., Bianco A. Double functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery // *Chem. Commun.* – 2006. – No 11. – P. 1182–1184.
 4. Mahmood M., Karmakar A., Fejleh A., Mocan T., Iancu C., Mocan L., Iancu D.T., Xu Y., Dervishi E., Li Z., Biris A.R., Agarwal R., Ali N., Galanzha E.I., Biris A.S., Zharov V.P. Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of carbon nanotubes and anti-tumor drug // *Nanomedicine (London)*. – 2009. – No 4. – P. 883–893.
 5. Liu Z., Fan A.C., Rakhra K., Sherlock S., Goodwin A., Chen X., Yang Q., Felsher D.W., Dai H. Supramolecular stacking of doxorubicin on carbon nanotubes for in vivo cancer therapy // *Angew. Chem.* – 2009. – V. 41, No 48. – P. 7668–7672.
 6. Chen J., Chen S., Zhao X., Kuznetsova L.V., Wong S.S., Ojima I. Functionalized single-walled carbon nanotubes as rationally designed vehicles for tumor-targeted drug delivery // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – V. 49, No 130. – P. 16778–16785.
 7. Dolatabadi J.E.N., Jamali A.A., Hasanzadeh M., Yadollah O. Quercetin delivery into cancer cells with single walled carbon nanotubes // *Intern. J. Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. 2011. – V. 1, No 1. – P. 21–25.
 8. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – Москва: Наука, 1974. – 256 с.
 9. Кольтовер В.К. Спиновые метки и зонды в исследованиях модельных и биологических мембран // *Итоги науки и техники. ВИНТИ. Биофизика*. – 1979. – Т. II. – С. 10–100.
 10. Жданов Р.И. Парамагнитные модели биологически активных соединений. – Москва: Наука, 1981. – 280 с.
 11. Розанцев Э.Г. Свободные иминоксильные радикалы. – Москва: Химия, 1970. – 216 с.
 12. Bulusheva L.G., Okotrub A.V., Lavskaya Yu.V., Vyalikh D.V., Dettlaff-Weglikowska U., Fonseca A., Hata K. Comparative NEXAFS examination of single-wall carbon nanotubes produced by different methods // *Phys. Status Solidi B*. – 2009. – V. 246, No 11–12. – P. 2637–2640.
 13. Melezhyk A.V., Yanchenko V.V., Sementsov Yu.I. Nanocarbon materials // *Hydrogen Materials Science and Chemistry of Carbon Nanomaterials. NATO Security through Science, Series A: Chemistry and Biology*. Springer Science+Business Media. – 2007. – P. 529–537.
 14. Vlasova I.I., Vakhrusheva T.V., Sokolov A.V., Kostevich V.A., Gusev A.A., Gusev S.A., Melnikova V.I., Lobach A.S. PEGylated single-walled carbon nanotubes activate neutrophils to increase production of hypochlorous acid, the oxidant capable of degrading nanotubes // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2012. – V. 264, No 1. – P. 131–142.
 15. Salvador-Morales C., Flahaut E., Sim E., Sloan J., Green M.L.H., Sim R.B. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes // *Molecular Immunology*. – 2006. – V. 4, No 3. – P. 193–201.
 16. Сергеев П.В. Биохимическая фармакология. – Москва: Высшая школа, 1982. – С. 82–93.

ДОСТАВКА ЛІПОФІЛЬНИХ СПІНОВИХ ЗОНДІВ ВУГЛЕЦЕВИМИ НАНОТРУБКАМИ В ЕРИТРОЦИТИ ТА ПЛАЗМУ КРОВІ

Л.В. Іванов¹, О.М. Ляпунов², М.Т. Картель¹, О.А. Нардід⁵, А.В. Окотруб³,
І.А. Кирилюк⁴, Я.О. Черкашина⁵.

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

²Інститут монокристалів НАН України, Харків;

³Інститут неорганічної хімії СВ РАН, Новосибірськ;

⁴Новосибірський державний університет, Новосибірськ;

⁵Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків

З використанням методу електронного парамагнітного резонансу проведена оцінка зв'язування (нековалентної сорбції) ряду спінових зондів, які становлять парамагнітні моделі ліпофільних фізіологічно активних речовин, вуглецевими нанотрубками різної структури, а також особливостей переходу (трансдифузії) зондів з поверхні нанотрубок на білки плазми і мембрани еритроцитів при контакті (інкубації) з компонентами крові. Показано, що ліпофільні зонди, що не мають іоногенних груп, утворюють стійкі комплекси з одно- і багатостінними вуглецевими нанотрубками, тоді як зонд з четвертинною амонієвою групою на трубках практично не сорбується. При контакті комплексів «зонд-нанотрубка» з плазмою і еритроцитами крові експериментальних тварин протягом декількох годин спостерігається десорбція зондів (до 15%) за рахунок їх взаємодії з білками плазми, а також прогресуюче проникнення в ліпідний подвійний шар мембрани еритроцитів. Продемонстровано, що метод спінових зондів дозволяє оцінювати ефективність нанотрубок як засобів доставки цільових речовин до клітин-мішеней і визначати локалізацію зондів в мембранах і внутрішньоклітинному просторі.

DELIVERY OF SPIN PROBES BY CARBON NANOTUBES IN ERYTHROCYTES AND PLASMA OF BLOOD

L.V. Ivanov¹, O.M. Lyapunov², M.T. Kartel¹, O.A. Nardid⁵, A.V. Okotrub³,
I.A. Kirilyuk⁴, Ya.O. Cherkashina⁵.

¹Chuiko Institute of Surface Chemistry, NAS of Ukraine, Kyiv;

²Institute of Single Crystals, NAS of Ukraine, Kharkiv;

³Institute of Inorganic Chemistry, SB of RAS, Novosibirsk;

⁴Novosibirsk State University, Novosibirsk;

⁵Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine, Kharkiv

Using the method of electron spin resonance assessed binding (non-covalent adsorption) of several spin probes, which are paramagnetic model lipophilic physiologically active substances, carbon nanotubes with different structures, and features of the transition (trans-diffusion) probes with nanotubes on the surface proteins of plasma and erythrocyte membrane in contact (incubation) with blood components. It is shown that the lipophilic probes having no ionic groups form stable complexes with mono- and multi-walled carbon nanotubes, whereas the probe with a quaternary ammonium group on the tubes practically do not adsorbed. Upon contact complexes "nanotube-probe" with the plasma and red blood cells in experimental animals within a few hours there is desorption probes (up to 15%) due to their interaction with plasma proteins as well as progressive penetration into lipid double layer erythrocyte membrane. It is demonstrated that the method of spin probes allows assessing the effectiveness of nanotubes as delivery means of targeted substances to target cells and to determine the localization of the probe in the membranes and intracellular space.